

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 - N° 135

**CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE LA GAMMA-HEMOLYSINE
STAPHYLOCOCCIQUE**

THESE

présentée à l'Université Claude-Bernard
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques
et soutenue publiquement le 6 Juillet 1977
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Monsieur Haissam NADRA

né le 7 Juin 1952

à MARMARITA (Syrie)

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 - N° 28



Digitized by the Internet Archive
in 2026

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE LA CINETIQUE
ETAT-TRANSITION

THESE

présentée et soutenue par
Monsieur H. NADRA
Docteur en Pharmacie

et acceptée par le jury le 10 juillet 1977

Président du jury : M. J. B. B. B.

DOCTEUR D'ETAT EN PHARMACIE

par

Monsieur H. NADRA

né le 7 Juin 1928

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 - N° 135

**CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE LA GAMMA-HEMOLYSINE
STAPHYLOCOCCIQUE**



THESE

présentée à l'Université Claude-Bernard
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques
et soutenue publiquement le 6 Juillet 1977
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Monsieur Haissam NADRA

né le 7 Juin 1952

à MARMARITA (Syrie)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON I
UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1977 - N° 122

CONTRIBUTION A L'ETUDE
DE LA GAMMA-HEMOLYSINE
STAPHYLOCOCCIQUE



THESE

présentée à l'Université Claude-Bernard
Unité d'enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques
et soutenue publiquement le 2 Juillet 1977
pour obtenir le grade de
DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

par

Monsieur Haisam MADRA

né le 7 Juin 1952

à MARMARITA (Syrie)

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD LYON I

PRESIDENT : M. le Professeur D. GERMAIN

PREMIER VICE-PRESIDENT : M. le Professeur ELBAZ

DEUXIEME VICE-PRESIDENT : M. P. PONCET, Maître-Assistant

TROISIEME VICE-PRESIDENT : M. C. BADOR, Etudiant

SECRETAIRE GENERAL DE L'UNIVERSITE : M. J. RAMBAUD,
Administrateur Civil

DIRECTEURS DES UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE :

U.E.R. de MEDECINE GRANGE-BLANCHE : Monsieur Bernard SALLE, M.C.A.

U.E.R. de MEDECINE ALEXIS-CARREL : Monsieur le Pr René MORNEX

U.E.R. de MEDECINE LYON-NORD : Monsieur Jean-Pierre NEIDHART, M.C.A.

U.E.R. de MEDECINE SUD-OUEST : Monsieur le Pr Jean NORMAND

U.E.R. des SCIENCES PHARMACEUTIQUES : Monsieur le Pr
Charles-Albert BIZOLLON

U.E.R. de TECHNIQUES DE READAPTATION : Monsieur Alain MORGON, M.C.A.

U.E.R. de BIOLOGIE HUMAINE : Monsieur Jean-Pierre REVILLARD, M.C.A.

U.E.R. I.R.E.P.S. : Monsieur Albert MILLON, Professeur d'E.P.S.

U.E.R. de SCIENCES ODONTOLOGIQUES : Monsieur le Dr Roger VINCENT

U.E.R. de MATHEMATIQUES : Monsieur le Pr Edmond COMBET

U.E.R. de PHYSIQUE : Monsieur le Pr Jean DELMAU

U.E.R. de CHIMIE-BIOCHIMIE : Monsieur le Pr Jean HUET

U.E.R. de SCIENCES DE LA NATURE : Monsieur le Pr René GINET

U.E.R. de SCIENCES PHYSIOLOGIQUES : Mademoiselle le Pr
Jeanne-Françoise WORBE

U.E.R. de PHYSIQUE NUCLEAIRE : Monsieur le Pr Mark GUSAKOW

I.U.T. N° 1 : Monsieur le Pr Bernard POUYET

I.U.T. N° 2 : Monsieur J. GALLET, Directeur E.N.S.A.M.

OBSERVATOIRE DE LYON : Monsieur Guy MONNET, Astronome Adjoint

U.E.R. de MECANIQUE : Mademoiselle le Pr Geneviève COMTE-BELLOT

T R A V A I L

du Département d'Immunologie
de l'INSTITUT PASTEUR DE LYON,

(Professeur M. CARRAZ, Madame C. VEYSSEYRE)

et du Département de Microbiologie - Immunologie
Pharmaceutique de l'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE
RECHERCHES DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES DE LYON,

(Professeur M. CARRAZ)

A MES PARENTS

*En espérant que tous leurs sacrifices
ne sont pas restés vains.*

Avec toute mon affection et ma reconnaissance.

A MA FIANCEE, SAMIRA

*qui a su me soutenir haut le moral tout au
long de ce travail et qui a partagé avec
moi mes joies et mes chagrins.*

A MES SOEURS

A MON FRERE

A TOUTE MA FAMILLE

A TOUS MES AMIS

et en particulier à NAJIB et GEORGES.

A NOTRE MAITRE ET PRESIDENT DE THESE :

MONSIEUR LE PROFESSEUR M. CARRAZ

Il nous a fait le grand honneur de nous accepter à l'Institut Pasteur de Lyon. Son accueil chaleureux réconforte et aide les étudiants étrangers, sa grande humanité et sa bonté nous touchent beaucoup. Nous l'en remercions très sincèrement.

Il a dirigé et suivi nos travaux avec bienveillance et enthousiasme en nous faisant bénéficier de son expérience et de ses vastes connaissances de chercheur.

Qu'il veuille bien trouver dans ce travail la marque de notre profonde reconnaissance et de notre respectueuse admiration.

AUX MEMBRES DE NOTRE JURY :

MONSIEUR LE PROFESSEUR L. ODDOUX

Il nous a dirigé dans nos études en nous manifestant toujours sa confiance. Son dynamisme et son érudition nous ont aidé au cours de la préparation de notre C.E.S.

Nous sommes fier de nous compter parmi ses élèves, et le prions de croire à notre respectueux dévouement.

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. TERRAILLON

Nous le remercions pour l'accueil bienveillant qu'il nous a réservé. Sa présence dans notre Jury est pour nous un gage vivifiant de compétence et de compréhension chaleureuse.

Nous l'assurons de notre profonde gratitude.

MONSIEUR LE PROFESSEUR E. LEJEUNE

Nous le remercions de l'honneur qu'il nous a fait en acceptant très aimablement d'être parmi nos Juges. Il a bien voulu s'intéresser à notre travail, et plusieurs de ses patients forment le substrat de cette thèse.

Nous le prions de croire à notre profond respect.

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. FLEURETTE

Nous le remercions sincèrement de l'attention qu'il nous a portée en acceptant de faire partie du Jury de notre thèse.

Les brefs contacts que nous avons eus avec lui nous ont profondément séduit.

A MADAME C. VEYSSEYRE

Elle est l'instigatrice du sujet de notre thèse ; elle seule a rendu possible le début de nos recherches. Tout au long de ce travail, elle a été une conseillère attentive et a su partager quotidiennement nos efforts.

Nous apprécions ses qualités humaines, son extrême dévouement et sa grande compétence.

Nous espérons pouvoir continuer à travailler sous son égide.

Que cet ouvrage soit le témoignage de notre reconnaissance.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR QUENEAU

*Nous tenons à le remercier pour l'aide
qu'il nous a apportée tout au long de ce
travail.*

*Qu'il trouve ici l'expression de nos
remerciements.*

A MADEMOISELLE C. VEYSSEYRE

*qui a bien voulu nous prêter sa collabo-
ration.*

*Avec toute notre sympathie et notre
amitié.*

A MONSIEUR LE DOCTEUR A.G. TAYLOR

*Nous le remercions d'avoir accepté
de contrôler notre gamma-hémolysine et de
nous avoir encouragé dans ce travail.*

A MONSIEUR J.C. FORGEMONT,

Directeur Administratif de l'Institut Pasteur de Lyon

Nous le remercions pour son aide, sa compréhension, et l'organisation efficace qu'il a mise à notre disposition et qui a assuré la réussite de ce travail.

Que cet ouvrage soit le témoignage de notre sincère amitié et de notre meilleure sympathie.

A TOUS LES MEMBRES

du Département d'Immunologie
de l'Institut Pasteur de Lyon

pour leur accueil amical.

Qu'ils trouvent ici l'expression de
notre sincère amitié.

Et en particulier A MESDAMES :

G. HEIM, M.C. THOMASSET, C. BELLA et B. FLORITA

Nous les remercions toutes. Elles nous ont fait comprendre ce qu'est le bon travail de groupe, et nous avons passé auprès d'elles des moments que nous n'oublierons pas.

A MADEMOISELLE A.M. SCHWARTZ

qui a effectué le travail de secrétariat avec compétence et gentillesse, nos sincères remerciements.

A MADAME J. GUY

qui s'est toujours montrée disponible pour le travail de secrétariat.

A MONSIEUR P. TACHON

*Chef du Service d'Immuno-Chimie
de l'Institut Pasteur de Lyon*

pour ses conseils amicaux.

Et AUX TECHNICIENS

*qui ont assuré avec bonne volonté
nos titrages.*

A MONSIEUR M. LECLERCQ

*qui a bien voulu nous effectuer les
dosages d'acides aminés avec compétence.*

A MONSIEUR J. BERCHET

pour sa collaboration.

A TOUTES LES SECRETAIRES DE DIRECTION
de l'Institut Pasteur de Lyon

A TOUT LE PERSONNEL

*du Département de Microbiologie - Immunologie Pharma-
ceutique de l'UNITE D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES DE LYON.*

P L A N

INTRODUCTION.

Première Partie : LES HEMOLYSINES STAPHYLOCOCCIQUES.

1. LES DIFFERENTES HEMOLYSINES STAPHYLOCOCCIQUES.

Introduction.

1.1. L'alpha-hémolysine.

- Production.
- Purification.
- Caractères physico-chimiques.
- Toxicité de l'alpha-hémolysine.
- Mécanisme d'action.

1.2. La bêta-hémolysine.

- Production.
- Purification.
- Caractères physico-chimiques.
- Toxicité.
- Mécanisme d'action.

1.3. La delta-hémolysine.

- Production.
- Purification.
- Caractères physico-chimiques.
- Toxicité.
- Mécanisme d'action.

1.4. La gamma-hémolysine.

- Production.
- Purification.
- Caractères physico-chimiques.
- Toxicité de la gamma-hémolysine.
- Mécanisme d'action.

1.5. L'epsilon-hémolysine.

1.6. Tableaux récapitulatifs.

2. ROLE DES HEMOLYSINES DANS LE POUVOIR PATHOGENE DU STAPHYLOCOQUE.

3. LA REPONSE IMMUNITAIRE VIS-A-VIS DES HEMOLYSINES STAPHYLOCOCCIQUES.

Deuxième Partie : TRAVAUX PERSONNELS.

1. PREPARATION ET PURIFICATION DE LA GAMMA-HEMOLYSINE STAPHYLOCOCCIQUE.

1.1. Introduction.

1.2. Exposé de la technique de préparation et de purification utilisée.

1.2.1. Production.

1.2.1.1. Entretien et préparation de
la souche.

1.2.1.2. Milieux utilisés pour la
production de la gamma-hémolysine.

1.2.1.3. Conditions de culture.

1.2.1.4. Séparation de la toxine.

1.2.1.5. Purification et conservation.

1.3. Méthode de titrage de la gamma-hémolysine.

1.3.1. Principe et généralités.

1.3.2. Définition de l'unité de toxine.

1.3.3. Déroulement du dosage.

1.3.4. Etude des différents facteurs intervenant dans le titrage de la gamma-hémolysine.

A) Les globules rouges humains.

B) Tampon.

C) Température et durée de la réaction.

1.4. Recherche des activités hémolytiques autres que la gamma (alpha, bêta, delta).

1.4.1. Recherche de la toxine alpha.

1.4.2. Recherche de la toxine bêta.

1.4.3. Recherche de la toxine delta.

1.5. Essais et résultats des productions.

1.5.1. Résultats obtenus en milieu CCY.

1.5.2. Résultats obtenus en milieu EGY.

1.5.3. Purification de la toxine.

1.6. Exposé des différents facteurs et discussion de leur rôle dans la production de la gamma-hémolysine.

1.7. Caractères et étude de la gamma-hémolysine obtenue.

1.7.1. Dosage de protéine.

1.7.2. Analyse des acides aminés.

1.7.3. Etude immuno-chimique.

1.7.4. Spectre d'activité hémolytique.

1.7.5. Action des inhibiteurs.

2. RECHERCHE DES ANTICORPS ANTI-GAMMA-HEMOLYSINE ET ANTI-ALPHA-HEMOLYSINE.

Introduction.

2.1. Méthode de titrage des anticorps anti-gamma-hémolysine.

2.1.1. Principe de dosage.

2.1.2. Matériel.

2.1.3. Méthode de titrage.

2.1.4. Reproductibilité et concordance.

2.2. Méthode de titrage des anticorps anti-alpha-hémolysine.

2.2.1. Principe de dosage.

2.2.2. Matériel.

2.2.3. Méthode de titrage.

3. EXPERIMENTATION ANIMALE.

Introduction.

3.1. Détermination du taux normal d'anti-gamma- hémolysine chez le lapin.

3.2. Etude de la réponse des anticorps anti-gamma- hémolysine staphylococcique au cours de l'ostéo-arthrite expérimentale du lapin.

3.2.1. Protocole expérimental.

3.2.2. Résultats.

3.2.3. Discussion.

3.2.4. Rôle des immuno-stimulants dans l'immunisation ostéo-articulaire.

3.3. Etude comparative de la réponse en anticorps anti-gamma et anti-alpha-hémolysine staphylococcique au cours de l'ostéo-arthrite expérimentale chez le lapin.

3.3.1. Résultats.

3.3.2. Discussion.

3.4. Etude de l'activité immunogène de la gamma-hémolysine.

3.4.1. Protocole expérimentale.

3.4.2. Résultats.

3.4.3. Discussion.

Conclusion.

4. ETUDE CLINIQUE.

Introduction.

4.1. Matériel et méthode.

4.2. Détermination du taux normal d'anti-gamma-hémolysine.

4.3. Etude du taux d'anticorps anti-gamma-hémolysine chez les sujets présentant une ostéo-arthrite infectieuse.

Conclusion.

CONCLUSIONS.

SUMMARY.

BIBLIOGRAPHIE.

TABLE DES MATIERES.

INTRODUCTION

Le staphylocoque, *Staphylococcus aureus* ou *epidermidis*, est connu pour produire un grand nombre de métabolites extra-cellulaires, et en particulier des hémolysines.

L'individualité de ces hémolysines a été peu à peu précisée, et on a suggéré que leur nombre et l'importance de leur production pouvaient être corrélés avec le caractère pathogène du germe.

Bien qu'aucune maladie ne puisse être spécifiquement reliée à une souche donnée, on se pose la question de savoir si une souche peut être responsable de telle ou telle affection staphylococcique et, dans cet ordre de recherche, la présence d'anticorps dirigés contre les antigènes extra-cellulaires représente une indication intéressante.

La synthèse d'anticorps spécifiques chez les patients est induite par les toxines libérées pendant l'infection. Le développement de la réponse immune est inégal et dépend du site de l'infection et du développement clinique. Dans les affections cutanées, la réponse est faible et, semble-t-il, il en est de même dans les affections respiratoires et septicémiques, mais cette réponse apparaît plus franche dans les affections systémiques profondes.

L'impossibilité ou la difficulté d'identification bactériologique du germe sont fréquentes dans ces cas-là, et tout spécialement en pathologie ostéo-articulaire. Aussi, a-t-on attribué une valeur diagnostique importante à la recherche et au dosage des anticorps anti-hémolysines. On reconnaît que l'élévation du taux des anticorps anti-alpha-hémolysine représente un moyen intéressant de diagnostic et de surveillance de la maladie. Mais, comme dans la maladie streptococcique, la réponse immune ayant un caractère individuel et non systématique, seul un bilan sérologique plus étendu permet de saisir la réponse immune dans toute son étendue, et TAYLOR a suggéré que la recherche des anticorps anti-gamma-hémolysine représentait le premier test complémentaire souhaitable dans le diagnostic des ostéo-arthrites staphylococciques.

Au cours de ce travail, nous nous sommes proposé de préparer et, si possible, de purifier de la gamma-hémolysine staphylococcique.

Disposant de l'antigène nécessaire, nous avons ensuite étudié l'apparition et le développement de la réponse immune anti-gamma-hémolysine, au cours de l'ostéo-arthrite expérimentale staphylococcique chez le lapin.

La dernière partie de notre travail comporte une étude clinique chez l'homme. Le taux des anticorps anti-gamma-hémolysine et anti-alpha-hémolysine a été recherché dans un groupe de sujets présentant des ostéoarthrites d'origines diverses, avec l'objectif de dégager l'intérêt d'une investigation sérologique plus étendue dans les staphylococcies profondes.

Avant d'entreprendre ce travail, il nous a paru intéressant de faire un rappel des données actuelles concernant les différentes hémolysines du staphylocoque.

PREMIÈRE PARTIE

LES

HEMOLYSINES STAPHYLOCOCCIQUES

1.

LES DIFFERENTES
HEMOLYSINES STAPHYLOCOCCIQUES

INTRODUCTION :

Dès 1872, KLEBS a suspecté la relation existant chez les bactéries entre la pathogénicité et l'aptitude à la production de toxine. Seize ans plus tard, CHRISTMAS montre la toxicité du bouillon de culture chauffé, de staphylocoque isolé de lésions cutanées. L'activité lytique vis-à-vis des érythrocytes d'un tel bouillon est observée pour la première fois en 1894 par VAN DE VELDE et est confirmée en 1900 par KRAUSS et CLAIRMONT.

Peu à peu, les bactériologistes sont amenés à décrire le rôle des différentes toxines produites par *Staphylococcus aureus* et leur relation avec le pouvoir pathogène du germe. Mais l'étude des hémolysines du staphylocoque n'entre dans une phase réellement active qu'à la suite de la tragédie qui se déroula en 1928 dans une petite ville d'Australie, où 17 des 21 enfants vaccinés contre la diphtérie moururent du fait d'une contamination du vaccin par *S. aureus* (24, 25).

La préparation vaccinnante révéla des propriétés hémolytique et léthale vis-à-vis du lapin et, compte tenu des symptômes présentés par les enfants, on attribua la responsabilité de l'accident à une toxine hémolytique. Cette tragédie mit en évidence les propriétés toxiques et invasives du staphylocoque, mais la connaissance de la nature et du mode d'action des différents produits élaborés par ce germe est relativement récente.

S. aureus peut produire trois hémolysines dénommées alpha, bêta, delta, dans l'ordre de leur découverte. Les activités hémolytique et létale des bouillons de culture de staphylocoque furent attribuées à l'alpha-hémolysine jusqu'à ce que GLENNY et STEVENS, en 1935 (65), isolent la bêta-hémolysine, active à 4°. En 1947, WILLIAMS et HARPER (177) détectent la delta-hémolysine, active sur les érythrocytes de mouton.

Une quatrième hémolysine staphylococcique a été décrite par SMITH et PIERCE en 1938 (150), l'existence de la delta et de la gamma-hémolysine a été longtemps controversée et leur activité attribuée à l'hémolysine alpha décrite par MORGAN.

Les études de ELEK et LEVY (48), de MARK (117), de JACKSON (82), ont progressivement permis d'établir l'individualité de ces quatre hémolysines staphylococciques alpha, bêta, gamma, delta et, à partir de là, leurs activités et leur place dans la virulence du Staphylocoque.

1.1. L'ALPHA-HEMOLYSINE

- PRODUCTION -

Les milieux les plus favorables à la production d'alpha-hémolysine sont restés longtemps les milieux complexes proposés par WALBUM (174) et par DOLMAN-WILSON (42). L'action favorisante d'une incubation dans un mélange de 10-20 % CO_2 /air a été discutée et différemment interprétée, soit que le CO_2 agisse comme tampon, soit qu'il intervienne directement dans la formation d'acides aminés essentiels à la production de toxine (25, 143).

Cependant, GLADSTONE, utilisant des milieux synthétiques, a pu montrer que le CO_2 n'augmentait pas le titre hémolytique et que, au contraire, l'oxygène était indispensable (60).

La présence d'une faible proportion de gélose, agissant comme absorbant d'inhibiteur, peut assurer une production sensiblement plus élevée, sans cependant être indispensable (34).

On ne sait que peu de choses sur les facteurs nutritionnels qui conditionnent la production d'alpha-hémolysine. GLADSTONE (60) a montré que les acides aminés essentiels étaient l'arginine, la glycine et la proline. DALEN, dans son étude, a confirmé ces exigences et a précisé le rôle primordial de l'histidine, la sérine et la glycine n'intervenant que comme précurseurs de cette dernière (36, 37, 38).

L'interrelation entre les différents acides aminés apparaît complexe et leur concentration relative critique.

DUNCAN et CHO (45) ont précisé que la présence de 0,2 % de glucose assurait une production maximale d'alpha-hémolysine. Par contre, les inhibiteurs de la synthèse protéique empêchent la production d'hémolysine (180, 4).

Cependant, la biosynthèse de l'alpha-toxine n'est pas simplement liée à la possibilité de synthèse protéique cellulaire. Une bonne pousse ne s'accompagne pas systématiquement d'une bonne production de toxine qui est étroitement liée aux facteurs d'environnement. Le mécanisme de contrôle de la synthèse de l'alpha-hémolysine n'est pas connu. Actuellement, l'utilisation de milieux comportant ou de l'hydrolysât de caséine, ou de la peptone - soja et de l'extrait de levure, permet une bonne production d'alpha-toxine (62, 112, 14; 34, 66). avec ou sans incubation de CO_2 .

La majorité des souches de staphylocoque coagulase positives fraîchement isolées produisent de l'alpha-hémolysine. Cependant, la plupart des études ont, à la suite de BURNET, fait appel à la souche Wood 46. ELEK a avancé l'idée que le taux de production de toxine dans une culture reflétait l'équilibre entre les variants de la population, aptes ou inaptes à cette production ; les conditions de culture doivent être telles qu'elles doivent favoriser la prédominance des premiers, ce qui, d'après certains, existent, de fait, systématiquement in vivo (53).

Comme pour les autres toxines bactériennes, BLAIR a pu montrer que la lysogénisation d'une souche non toxigène par une phage provenant d'une souche toxigène conférait la toxigénicité (20).

Les études classiquement conduites sur la souche Wood 46 ont montré que l'alpha-hémolysine était formée durant

la phase logarithmique de croissance (4), et DUNCAN et CHO (44) ont montré qu'elle était libérée par des cellules intactes puisque cette production coïncide avec un taux bas d'ADN présent dans le milieu, et il semble que seulement un très faible pourcentage de la sécrétion reste lié au corps cellulaire (111).

L'étude pratiquée en microscopie électronique à l'aide d'un sérum anti-alpha-hémolysine marqué à la ferritine par COULTER (35) a montré que l'alpha-toxine se forme juste à l'intérieur de la membrane cytoplasmique ou s'y accumule, puis traverse rapidement la paroi cellulaire et atteint le milieu extérieur. Ceci semble confirmer l'hypothèse de HALLANDER (73) selon laquelle le rôle de l'alpha-toxine se situe plus au niveau d'une modification et d'un contrôle de la perméabilité de la membrane qu'à celui de la virulence du germe.

- PURIFICATION -

De nombreuses méthodes de purification permettent d'obtenir une alpha-hémolysine hautement purifiée. D'une expérimentation abondante, quelques notions essentielles se dégagent : nécessité de partir d'un grand volume de toxine brute de haut titre, utilisation de milieux de culture non protéiques, éviction de tous procédés pouvant entraîner un risque d'agrégation qui diminue l'activité biologique du produit.

La purification comporte une phase initiale de concentration qui peut se faire par relargage au sulfate d'ammonium ou par précipitation au méthanol à pH 4 et à -5°C.

Différentes méthodes peuvent assurer la purification de l'alpha-hémolysine, mais aucune n'a encore abouti à l'obtention d'un produit cristallisé.

Le tableau I réunit les caractéristiques des principales méthodes de purification.

CASSIDY, très récemment, a proposé une méthode de purification concernant l'adsorption sur billes de verre et élution sélective (29), particulièrement rapide et efficace.

- CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES -

L'alpha-toxine est une protéine. La présence de groupements carbohydratés mis en évidence par GOSHI n'a pas été confirmée.

Les résultats de l'analyse des acides aminés conduite par différents auteurs sont exprimés dans le tableau II. Les résultats obtenus sont concordants. L'absence de cystéine indique que l'alpha-toxine ne présente aucun pont disulfure ou groupement sulfhydryl libre. La nature de l'acide aminé N-terminal est discutée, qui pourrait être l'histidine, ou l'arginine (34), ou l'alanine (147). La présence d'enzymes protéolytiques dans le bouillon de culture entraînant des coupures à divers niveaux expliquerait les différences de poids moléculaire notées d'un laboratoire à l'autre (10.000 à 50.000) et les deux hémolysines de SIX et HARSHMAN (147, 148), ainsi que les deux formes moléculaires de DALEN (39).

Le coefficient de sédimentation se situe entre 2,8 et 3,1 S (33, 14, 147). BERNHEIMER (14), aussi bien que LOMINSKI (109) et que GOODE (67), ont mis en évidence des fractions ayant un coefficient de sédimentation de 10 à 12S et qui correspondent à des agrégats d'hémolysine polymérisée et sont peu ou pas douées d'activité hémolytique et toxique. La désagrégation de ces fragments 12 S par l'urée aboutit à une hémolysine 3S active (5) et une étude en gel diffusion fait apparaître une

identité partielle entre les fractions 3 S et 12 S. Il semble que toute méthode de purification entraîne la formation d'une petite quantité d'hémolysine alpha-12 S, séparable par centrifugation en gradient de densité de l'alpha-hémolysine 3 S et de poids moléculaire situé entre 24.000 et 33.000.

L'alpha-toxine 3 S, elle-même, ne constitue pas une molécule homogène : centrifugée en gradient de saccharose, elle donne 4 pics de mobilité électrophorétique différente mais portant des activités biologiques identiques (14). L'analyse en ultracentrifugation confirme que, comme d'autres toxines, l'alpha-toxine staphylococcique est constituée d'un mélange de molécules de poids moléculaires différents (55). L'électro-focalisation montre que ses constituants ont un P.I. s'étageant de 6 à 9, le composant de P.I. 8,5 représentant environ 90 % de l'activité hémolytique (110, 170).

La thermo-sensibilité de l'alpha-hémolysine a été le sujet de nombreuses interprétations. Chauffée à 60°, elle donne un précipité inactif qui recouvre son activité soit par traitement par l'urée, soit par un bref chauffage à 100° (effet Arrhenius) ; ce qui peut être expliqué par une transformation de la forme 3 S en forme 12 S à la température de 60° et une redissociation des molécules agrégées (5).

Le tableau N° III donne les différents caractères de l'alpha-hémolysine d'après les divers auteurs.

- TABLEAU I -

Purification de l' α -hémolysine
(d'après WISEMAN)

REFERENCE	SOUCHE	METHODE	U.H./mg
MADOFF.....	Wood 46	A, B, C, D	$4,2 \times 10^4$
KUMAR.....	Wood 46	C, C	?
BERNHEIMER....	Wood 46	A, C, C, E	$1,9 \times 10^4$
GOSHI.....	?	A, A, D, D	8×10^8
LOMINSKI.....	Wood 46	A, B, D, A, D	$1,2 \times 10^5$
JACKSON.....	Wood 46 209-60	A, A, D	?
ROBINSON.....	?	A, A, D, C	?
COOPER.....	Wood 46	A, B, C, D, D	$1,2 \times 10^6$
COULTER.....	Wood 46	A, B, C	10^4
ARBUNOTT.....	Wood 46	A, C, C, E, F	2×10^8
WADSTROM.....	Wood 46	B, D, C, A, B	$2,2 \times 10^4$
FACKRELL, WISEMAN.....	Wood 46	A, A, B, A, D	$1,3 \times 10^5$
GOODE.....	Wood 46	A, C, C, G	$1,8 \times 10^4$
WATANABE.....	Wood 46	A, B, C, C, D, C	$5,1 \times 10^8$

A = précipitation ; B = gel filtration ;
 C = électrophorèse ou électrofocalisation ;
 D = chromatographie échangeuse d'ions ;
 E = fractionnement en gradient ;
 F = traitement par chaleur et urée.

- TABLEAU II -

*Analyse des acides aminés de l'alpha-hémolysine
(d'après WISEMAN)*

ACIDES AMINES	BERNHEIMER et SCHWARTZ	COULTER	FACKRELL et WISEMAN	SIX et HARSHMAN	
				A	B
Méthionine.....	10	4	2	6	6
Acide aspartique	44	50	20	40	43
Thréonine.....	23	23	10	22	23
Sérine.....	22	20	10	19	19
Acide glutamique	21	22	16	19	20
Proline.....	7	10	14	8	9
Glycine.....	23	24	28	20	24
Alanine.....	12	14	12	11	11
Valine.....	12	16	8	13	14
Isoleucine.....	13	16	6	13	14
Leucine.....	15	14	8	13	14
Tyrosine.....	9	10	6	9	10
Phénylalanine...	10	10	4	8	8
Lysine.....	23	26	12	21	23
Histidine.....	4	4	4	4	4
Arginine.....	10	8	6	8	8

- TABLEAU III -

Caractères physico-chimiques de l' α -hémolysine
(d'après WISEMAN)

REFERENCE	SOUCHE	S	P.M.	P.I.	N-TERMINAL
KUMAR.....	Wood 46	1,45	$1-1,5 \times 10^4$	-	-
BERNHEIMER et SCHWARTZ	Wood 46	3,0 12,0	$4,4 \times 10^4$	-	-
LEMINSKI et al.	Wood 46	3,1	-	-	-
COOPER et al.	Wood 46	2,8	-	-	-
COULTER....	Wood 46	2,8	$2,1 \times 10^4$	-	Histidine, arginine
ARBUTHNOTT.	Wood 46	3,0	-	-	-
WADSTROM...	Wood 46 V8, M18	-	-	8,5 (alpha I)	-
WISEMAN et CAIRD...	Wood 46	-	-	-	Histidine
FORLANT....	?	2,8	$3,3 \times 10^4$	-	-
Mc NIVEN et al.	Wood 46	-	$3,6 \times 10^4$	8,55 (alpha A)	-
SIX et HARSHMAN	Wood 46	3,0 (A) 3,0 (B)	$2,8 \times 10^4$ (A) $2,6 \times 10^4$ (B)	7,2 (A) 8,4 (B)	Alanine (A) Alanine (B)
FACKRELL et WISEMAN.	Wood 46	1,4	$4,5 \times 10^4$	8,5	Histidine
GOODE et BALDWIN.	Wood 46	3,0 10,5	-	8,65, 5,8	-
GOODE et BALDWIN.	57.2079 3558 3565	3,0 10,5	-	$8,65 \pm 0,15$	-
WATENABE et KATO....	Wood 46		$3,6 \times 10^4$	$7,98 \pm 0,05$	-

- TABLEAU III -

Caractères physico-chimiques de l' α -hémolysine
(d'après WISEMAN)

REFERENCE	SOUCHE	S	P.M.	P.I.	N-TERMINAL
KUMAR.....	Wood 46	1,45	$1-1,5 \times 10^4$	-	-
BERNHEIMER et SCHWARTZ	Wood 46	3,0 12,0	$4,4 \times 10^4$	-	-
LEMINSKI et al.	Wood 46	3,1	-	-	-
COOPER et al.	Wood 46	2,8	-	-	-
COULTER....	Wood 46	2,8	$2,1 \times 10^4$	-	Histidine, arginine
ARBUTHNOTT.	Wood 46	3,0	-	-	-
WADSTROM...	Wood 46 V8, M18	-	-	8,5 (alpha I)	-
WISEMAN et CAIRD...	Wood 46	-	-	-	Histidine
FORLANT....	?	2,8	$3,3 \times 10^4$	-	-
Mc NIVEN et al.	Wood 46	-	$3,6 \times 10^4$	8,55 (alpha A)	-
SIX et HARSHMAN	Wood 46	3,0 (A) 3,0 (B)	$2,8 \times 10^4$ (A) $2,6 \times 10^4$ (B)	7,2 (A) 8,4 (B)	Alanine (A) Alanine (B)
FACKRELL et WISEMAN.	Wood 46	1,4	$4,5 \times 10^4$	8,5	Histidine
GOODE et BALDWIN.	Wood 46	3,0 10,5	-	8,65, 5,8	-
GOODE et BALDWIN.	57.2079 3558 3565	3,0 10,5	-	$8,65 \pm 0,15$	-
WATENABE et KATO....	Wood 46		$3,6 \times 10^4$	$7,98 \pm 0,05$	-

- TOXICITE DE L'ALPHA-HEMOLYSINE -

L'alpha-hémolysine possède les caractéristiques d'une toxine : substance protéique de haut poids moléculaire d'origine microbienne, dotée de propriétés antigéniques et déterminant chez les animaux sensibles une perturbation des processus physiologiques normaux (4).

Elle exerce un effet léthal sur de nombreuses espèces animales. La sensibilité varie selon l'espèce, le lapin étant beaucoup plus sensible que la souris qui reste cependant l'animal de référence : la D.L. 50 en intra-veineuse est de 50 $\mu\text{g/kg}$ chez la souris contre 1,9 $\mu\text{g/kg}$ chez le lapin. Pour l'homme, la toxicité est voisine de celle de l'alpha-toxine de *Clostridium perfringens*, donc très inférieure à celle de la toxine diphtérique, tétanique ou botulique.

Injectée à petites doses sous la peau, l'alpha-toxine développe un pouvoir dermo-nécrotique pouvant résulter d'une action directe sur les tissus de la peau, soit d'une action sur la musculature lisse des vaisseaux de la peau.

L'action myotoxique de l'alpha-toxine a été largement mise en évidence sur la musculature lisse (108, 186, 4, 28). Elle représente un caractère propre à la toxine staphylococcique. L'action toxique s'exerce, semble-t-il, directement sur le muscle sans intervention de substances médiatrices, et elle est inhibée par un sérum anti-alpha-toxine. Cette activité myotoxique paraît être un facteur essentiel du pouvoir léthal de la toxine.

L'action de l'alpha-toxine sur l'organisme animal s'exerce par des mécanismes complexes qui interviennent également sur la circulation périphérique, le système nerveux central (4).

L'action cytotoxique de l'alpha-hémolysine a été vérifiée sur des souches types de cellules : cellules d'ascite, cellules L.K., cellules embryonnaires, cellules de rein de singe ou de lapin (101, 125, 14) et, plus récemment, cellules humaines diploïdes ou Hela (163), ou Wish (113). L'effet cytotoxique s'exerce à travers une désorganisation de la membrane cellulaire avec modification de la perméabilité pouvant aboutir à la lyse sans que cela représente son seul mode d'action.

L'alpha-toxine endommage les leucocytes (polynucléaires) de lapin, comme le font d'ailleurs la leucocidine et la delta-hémolysine. SZMIGIELSKI a montré qu'il y avait destruction sélective des lysosomes avec libération de phosphatase acide et de lysozyme (155). Son action sur les leucocytes humains paraît moins régulière et liée à la souche sécrétrice (61). Elle exerce également une action sur les plaquettes, qui se traduit par une modification de leur structure et de leur capacité fonctionnelle (15, 115).

L'action toxique s'exerce au niveau de la membrane : membrane cellulaire, mais également membrane lysosomiale et, irrégulièrement, mitochondriale (4).

Une activité anti-bactéries - essentiellement bactéries sans paroi - mise en évidence par BERNHEIMER n'a pas été confirmée. L'action lytique sur les protoplastes et sphéropastes serait attribuable à des contaminations de delta-hémolysine (4).

L'activité hémolytique de l'alpha-toxine s'exerce sur les érythrocytes de diverses espèces qui y sont différemment sensibles. Les globules rouges humains sont particulièrement résistants, tandis que les globules rouges de lapin sont très sensibles et leur lyse

représente un moyen d'étude de l'activité spécifique de l'alpha-toxine, celle-ci étant évaluée par le nombre d'unités contenues dans 1 mg de protéine ; mais la différence de sensibilité des individus appartenant à une même espèce (x 5 quelquefois) rend difficile la standardisation.

L'activité hémolytique de l'alpha-toxine vis-à-vis des érythrocytes de lapin est considérablement plus faible que celle de la bêta-hémolysine ou que celle de la hémolysine S du streptocoque. Une dose de 0,001 µg de ces toxines est encore hémolytique, alors que la dose minimum lytique de l'alpha-toxine est voisine du µg (4). L'unité hémolytique, d'après WISEMAN et CAIRD, est la plus haute dilution d'hémolysine donnant 50 % de la lyse des érythrocytes (185).

- MECANISME D'ACTION -

L'activité cytotoxique de l'alpha-toxine a fait l'objet de nombreuses études. Certaines ont porté sur divers types de cellules : cellules d'ascite, cellules en culture, et ont mis en évidence des mécanismes d'action très divers, sinon contradictoires : inhibition de transport d'ions (137), modification du taux d'adénosine-5'-diphosphate et d'ATP-ase (59, 155), inhibition de métabolisme (154), mais ces observations sont difficilement interprétables à cause de la non-pureté des toxines expérimentées.

Au cours d'une étude en microscopie électronique, PARADISI a montré que l'alpha-toxine déterminait une altération profonde des mitochondries de cellules Hep-2 qui constituait, selon lui, un élément essentiel de l'action cytotoxique de l'alpha-toxine sur la cellule (128).

Plus intéressante apparaît l'étude de l'activité lytique de la toxine sur l'érythrocyte. La lyse semble résulter de la fixation de la toxine sur la membrane. CASSIDY, en étudiant la fixation d'une alpha-toxine marquée à l'I¹²⁵ a confirmé l'existence de ces récepteurs et suggère qu'ils étaient de nature protéique ou glyco-lipoprotéique (27). KATO pense que le N-acétyl glucosamine ganglioside, qui neutralise la toxine, pourrait constitué ce récepteur (97).

L'étude de la cinétique de l'hémolyse des globules rouges de lapin a permis de distinguer deux phases dans l'hémolyse : une première intereaction d'allure enzymatique entre l'alpha-toxine et le globule rouge avec absorption de toxine et modification de la perméabilité sélective de la membrane et libération d'ion K, puis une phase de lyse indépendante de la présence de la toxine et insensible à l'action d'un sérum anti-toxine.

Des notions intéressantes ont été apportées par l'étude de l'action de la toxine sur des membranes artificielles phospholipidiques. Les membranes de Baughan constituées de sphérules présentent une perméabilité qui reproduit celle des membranes naturelles. Préparées en solutions salines, les sphérules captent les ions entre leurs deux couches. Leur libération constitue un modèle d'étude de l'action des substances sur surfaces actives. Dans ces conditions, l'alpha-toxine donne une rapide libération des ions, qui n'est pas influencée par les charges superficielles, mais peut être inhibée par un traitement préalable par l'anti-toxine (175).

BUCKELEW (22), étudiant l'interaction toxine - monocouche lipidique a montré que la toxine s'étale en film à la surface du milieu aqueux et ne pénètre dans la couche lipidique qu'en fonction de la structure de celle-ci. Selon lui, l'action de la toxine paraît liée à son activité superficielle et s'exercer par des interactions hydrophobes avec les lipides de la membrane.

Une étude conduite en microscopie électronique par FREER et ses collaborateurs (56, 6) a montré que la destruction des liposomes s'accompagne, simultanément avec l'adsorption de la toxine, de l'apparition de structures en anneau ayant le même aspect que l' α -12 S toxine. L' α -3 S toxine se polymériserait sur la membrane lipidique et formerait des agrégats qui, comme cela se passe avec l' α -12 S toxine, recouvrent sous l'action de l'urée leur activité hémolytique. D'après ARBUTHNOTT (6), c'est l'interaction toxine-phospholipide qui induit la polymérisation. Expérimentalement, il a d'ailleurs pu montrer que certains lipides : diglycéride, lécithine, cholestérol, ... induisent la polymérisation, seuls ou associés.

Ces structures en anneau ne se retrouvent pas sur la membrane bactérienne exposée à la toxine, ce qui peut être attribuable à l'absence de lécithine (ou de tout autre activateur) sur la membrane bactérienne.

Ces structures en anneau se retrouvent, par contre, sur les stromas des globules rouges de lapin ou humains traités par l' α -toxine, mais jamais avant hémolyse, ce qui signifierait que la formation de ces structures constitue une seconde interaction entre la toxine et la membrane déjà désorganisée.

BERNHEIMER (16), travaillant sur stromas fixés après dissociation par congélation et centrifugation (Freeze-Etching), a montré, en 1972, que l'action des différentes toxines staphylococciques se distinguait par une répartition caractéristique des structures en anneau. En utilisant une alpha-toxine parfaitement pure, FREER (57), en 1973, a pu confirmer dans une étude en microscopie électronique l'existence de ces structures et, utilisant le Freeze-Etching, a étudié les modifications micro-morphologiques correspondant à la réaction hydrophobe toxine-membrane.

Récemment, CASSIDY (29) a remis en question l'intérêt de l'étude des membranes artificielles quand il a mis en évidence que des sphérules constituées de phospholipide extrait d'érythrocytes humains, classiquement reconnus résistants à l'alpha-toxine, se montraient aussi sensibles à l'action de cette dernière que les sphérules constituées de phospholipide de globules rouges de lapin.

Une autre interprétation du mécanisme d'action de l'alpha-toxine a été apportée par les travaux de WISEMAN et CAIRD (184, 185). Pour ces auteurs, les protéinases membranaires de l'érythrocyte activent l'hémolysine alpha qui est initialement une protéase inactive : au cours de la lyse, il y a libération d'azote, et celle-ci est en corrélation avec la sensibilité de la cellule à la toxine. Un phénomène identique existe lorsque la toxine est mise à réagir avec de la protéine de membrane érythrocytaire exempte de lipide, mais ne se retrouve pas pour d'autres protéines et en particulier avec l'hémoglobine, à moins qu'un extrait membranaire soit ajouté. Un sérum antiprotéinases érythrocytaires de lapin empêche la toxine de lyser les érythrocytes de lapin. Il semble donc que

les protéinases de la membrane érythrocytaire représentent un système activateur de l'alpha-toxine.

Cependant, FREER (57) n'a pu mettre en évidence ni modification de la séquence des polypeptides au cours de l'hémolyse, ni l'inhibition de celle-ci par les inactivateurs des protéinases. De plus, les images de l'interaction toxine-membrane obtenues par lui en "Freeze-Etching" correspondent à une réaction de caractère hydrophobe telle qu'elle est décrite par SPETH (153).

En conclusion, l'activité de l'alpha-toxine résulte de son interaction avec un substrat situé dans la membrane cellulaire. Deux mécanismes d'activation sont proposés :

- L'activation de la toxine est induite par les lipides de la membrane. Il y a une désorganisation de celle-ci, perte de sa perméabilité sélective et, finalement, lyse.
- L'activation de la toxine est induite par un mécanisme protéolytique, initié par les protéinases de la membrane. Les protéines de la membrane constituent le substrat de la toxine activée. Les changements structuraux qui résultent de l'activation déterminent la lyse de la cellule.

Ces deux mécanismes pourraient se combiner et MOORE suggère que l'activité des protéinases érythrocytaires est associée à la présence d'une lipoprotéine de la membrane qui, réagissant avec l'alpha-toxine, la rend apte à recevoir l'activation protéolytique (60).

La complexité des mécanismes exprimant sa toxicité in vitro explique la difficulté où l'on se trouve de déterminer le rôle joué dans la pathogénicité du Staphylocoque par l'alpha-hémolysine et par les autres hémolysines dont elle ne peut être dissociée.

Aussi, nous étudierons globalement le rôle des hémolysines dans la virulence du Staphylocoque, ainsi que leur activité immunogène et la réponse immunitaire qu'elles suscitent.

1.2. LA BETA-HEMOLYSINE

GLENNY et STEVENS, en 1935, observent une dissociation de la neutralisation de l'activité hémolytique et de l'activité dermo-nécrotique d'une préparation d'alpha-hémolysine et mettent ainsi en évidence une nouvelle toxine staphylococcique, la bêta-toxine, antigéniquement différente de l'alpha-toxine et douée d'un pouvoir hémolytique accru par les basses températures (4° à 18°).

- PRODUCTION -

Ce sont les souches de *Staphylococcus aureus* d'origine animale (R 1 équine, 252 F canine, G 128 bovine) qui produisent le plus largement cette toxine.

La production de bêta-hémolysine peut se faire sur les milieux solides selon la technique utilisée pour la production d'alpha-toxine (178). Mais l'élimination des protéines non spécifiques représente un risque supplémentaire de dénaturation de la toxine (155).

Les milieux synthétiques ou semi-synthétiques ne permettent que de faibles rendements par rapport aux milieux complexes.

L'utilisation de milieux complexes mais entièrement dialysables a permis de définir les acides aminés essentiels à cette production, ce sont : l'arginine, la proline et la glycine, mais également la cystine, et la méthionine, la thiamine et la nicotamine, avec des variantes selon la souche étudiée (4, 31).

La présence du tryptophane apparaît, comme pour l'alpha-toxine, primordiale (146). Il n'a pas été encore possible de faire la distinction entre l'exigence de pousse et celle de production de bêta-hémolysine.

L'influence de l'environnement gazeux sur la production a été étudiée et le rendement comparé à celui obtenu en présence d'air (4, 180). Il est généralement admis que les mélanges CO_2 -air ou CO_2 -oxygène augmentent la production, à la concentration de 10 à 25 % (75, 31).

Le rôle du CO_2 dans l'augmentation du titre de bêta-hémolysine n'est pas élucidé, mais son action ne paraît pas liée à un accroissement de la pousse microbienne. Un pH voisin de la neutralité favorise à la fois la pousse et l'excrétion, tandis que l'adjonction de sucres dans le milieu n'améliore pas le rendement (76).

Le taux de production de la toxine est maximum dans le début de la phase logarithmique de croissance. En milieu solide ou semi-solide, elle reste élevée après 24 ou 48 heures de culture (4).

- PURIFICATION -

Les premières méthodes de purification faisant appel à des précipitations par l'éthanol, le méthanol ou l'acétone, ont été avantageusement remplacées par des méthodes de séparation plus modulées, donnant une bêta-hémolysine hautement purifiée.

Les méthodes les plus caractéristiques figurent dans le tableau N° IV.

Parmi ces méthodes, seule celle de MAHESWARAN permet d'obtenir une toxine ne contenant qu'un seul antigène, les autres méthodes donnent une toxine présentant deux composants antigéniques (113).

Toutes ces toxines sont remarquablement instables et leur conservation n'est possible (quelques mois) que sous forme lyophilisée.

- TABLEAU IV -

Purification de la bêta-hémolysine
(d'après WISEMAN)

REFERENCE	SOUCHE	METHODE	U.H./mg
ROBINSON.....	L 16	D, B, D, A	
JACKSON.....	J 32 A	D, D, B	
CHESBRO.....	UNH Donita	B	
WISEMAN.....	R 1, 252 F	B, D	10^6
WISEMAN-CAIRD.....	R 1, 252 F	B, D, C	
MAHESWARAN.....	J 19	D, C, B, B	7×10^4
GOW.....	MB 534	D, C, B, E	5×10^5
HAQUE.....	R 1	B, A, C	10^7
BERNHEIMER.....	G 128, R 1 234	D, D, A*	$2,6 \times 10^{11}$
WALDSTROM.....	R 1	B, A*, C	3×10^{11}

A = électrophorèse ;

B = chromatographie échangeuse d'ions ;

C = gel filtration ;

D = précipitation ;

E = électrophorèse en gradient de sucrose ;

A* = électrofocalisation.

- CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES -

De nombreuses études ont confirmé que la bêta-hémolysine est une protéine, mais son poids moléculaire semble dépendre de la souche productrice et du mode de préparation. Il se situe, selon les auteurs, entre 11.000 et 59.000 Dalton. Le point iso-électrique a été trouvé entre 9 et 9,5. Le tableau N° V résume ces données.

Selon HAQUE (75, 76), CHESBRO (31) et MAHESWARAN (113), elle comporterait une fraction majeure cationique et une fraction mineure anionique. Sa fraction cationique représente l'activité bêta-hémolytique et sa pureté a pu être confirmée par gel diffusion et électrophorèse. MOLLBY et WADSTRON (121) ont montré que la fraction anionique résultait d'un phénomène d'agrégation au cours de la purification.

L'analyse des acides aminés composant la bêta-hémolysine a été faite récemment par BERNHEIMER (17) et a confirmé les résultats de FACKRELL qui montrait la prépondérance de l'acide aspartique, l'acide glutamique, la sérine et la glycine (tableau N° VI).

- TOXICITE -

La toxicité de la bêta-hémolysine vis-à-vis de l'animal est discutée. Si HEYDRICK (79) met en évidence son pouvoir léthal en injection intrapéritonéale chez le cobaye et GOW (68) en injection intraveineuse chez le lapin, WISEMAN ne peut tuer ni la souris, ni le lapin, en leur injectant en intraveineuse ou en intrapéritonéale une toxine semi-purifiée (178). Selon WALDSTROM, sa toxicité serait faible : de 10 à 160 fois inférieure à celle de l'alpha-toxine. Son action s'exercerait indirectement avec un effet primaire sur

- TABLEAU V -

*Caractères physico-chimiques de la bêta-hémolysine
(d'après WISEMAN)*

REFERENCE	SOUCHE	S	P.M.	P.I.	ACTIVITE ENZYMATIQUE
GOW.....	MB 534	1,7	-		?
MOLLBY.....	R 1	-	-	$9,5 \pm 0,1$	?
CHESBRO.....	UNH 15	-	$1,55 \times 10^4$	-	?
WADSTROM...	R 1	-	$3,8 \times 10^4$	$9,4 \pm 0,1$	Sphingomyélinase
FACKRELL...	R 1	1,8	$2,6 \times 10^4$ $1,61 \times 10^4$	9,5	Sphingomyélinase
BERNHEIMER.	G 128, R 1, 234	-	3×10^4 3×10^4	$9,0 \pm 0,1$	Sphingomyélinase
MAHESWARAN.		-		9,5	Sphingomyélinase
CHESBRO.....	UNH Donita	-	$5,9 \times 10^4$	-	Carbohydase (?)

- TABLEAU VI -

Analyse des acides aminés de la bêta-hémolysine
(d'après WISEMAN)

ACIDES AMINES	RESIDUS	
	BERNHEIMER	FACKRELL
Acide aspartique.....	44	44
Thréonine.....	14	17
Sérine.....	23	33
Acide glutamique.....	25	38
Proline.....	10	0
Glycine.....	21	39
Alanine.....	12	25
Valine.....	12	18
Cystine/Cystéine.....	0	4
Méthionine.....	4	0
Isoleucine.....	9	17
Leucine.....	12	20
Tyrosine.....	14	1
Phénylalanine.....	8	13
Lysine.....	28	33
Histidine.....	8	8
Tryptophane.....	6	?
Arginine.....	6	13

le système circulatoire (120). Elle a été reconnue dépourvue de pouvoir dermo-nécrotique en présence ou en l'absence de Mg^{++} (155, 178).

Son action cytotoxique a été étudiée sur de nombreux types de cellules. WISEMAN a détecté une activité lytique sur cellules amnioniques, cellules KB et cellules de rein de singe, en utilisant le test d'exclusion au bleu Trypan (182). L'étude morphologique des cellules incubées avec la bêta-hémolysine fait apparaître des modifications de taille et de structure.

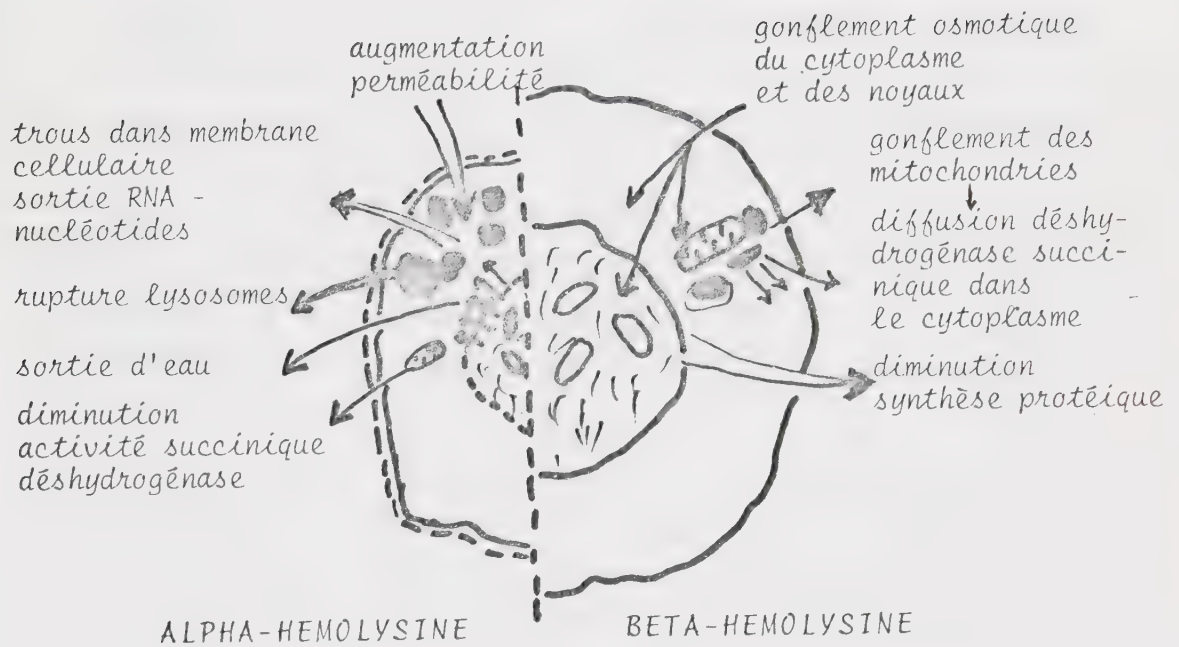
L'action de la bêta-toxine sur les cellules Hela et les fibroblastes reste discutée (163, 61). Récemment, THELESTAM a confirmé que la bêta-toxine était responsable de modifications de leur membrane, mais ne déterminerait ni altération morphologique, ni métabolique (163).

SZMIGIELSKI, dans son étude sur les cellules humaines embryonnaires Wish, a comparé l'action cytotoxique de l'alpha et la bêta-toxine, et a montré qu'à des doses subcytotoxiques leur action in vitro diffère sensiblement (figure N° 1).

Une leucocytotoxicité est mise en évidence sur les polynucléaires de lapin. Elle ne s'accompagne pas de modifications morphologiques importantes, mais le pouvoir phagocytaire est diminué ainsi que la capacité de réduction du dichloro-phénol-indophénol (182).

SZMIGIELSKI a, de plus, montré qu'il y avait libération de toutes les enzymes des granules intercellulaires, contrairement à l'alpha-hémolysine qui détermine une libération sélective de certaines enzymes (157).

Il semble, malgré le manque de standardisation et le degré inégal de pureté des échantillons testés, que la bêta-toxine soit peu toxique pour les cellules ou les tissus. Cependant, son activité hémolytique constitue son caractère le plus marquant.



- Figure 1 -

Effets cytotoxiques de l'alpha et de la bêta-hémolysine
(d'après SZMIGIELSKI)

Les hématies de mouton et de boeuf sont très sensibles, celles de l'homme beaucoup moins, celles de lapin, rat, cobaye, sont résistantes. Le spectre de sensibilité des hématies vis-à-vis de la bêta-toxine provenant de différentes souches de *Staphylococcus aureus* est variable et, selon WISEMAN, les souches R 1 et G 12-gamma donnent une bêta-toxine à plus large action et à titre plus élevé que les souches P 92 et 252 F.

JACKSON (86), le premier, a montré que l'activité de la bêta-toxine était inhibée par dialyse au traitement par EDTA et que l'activité hémolytique est restaurée par addition de Mg^{++} et Mn^{++} . ROBINSON (142), HAQUE (75) et ensuite WISEMAN (181), ont confirmé que l'activité hémolytique de leur bêta-toxine était également augmentée par addition de Mg^{++} , Mn^{++} , Co^{++} . L'influence d'autres ions comme le Zinc, Fer ou Nickel, est plus discutable.

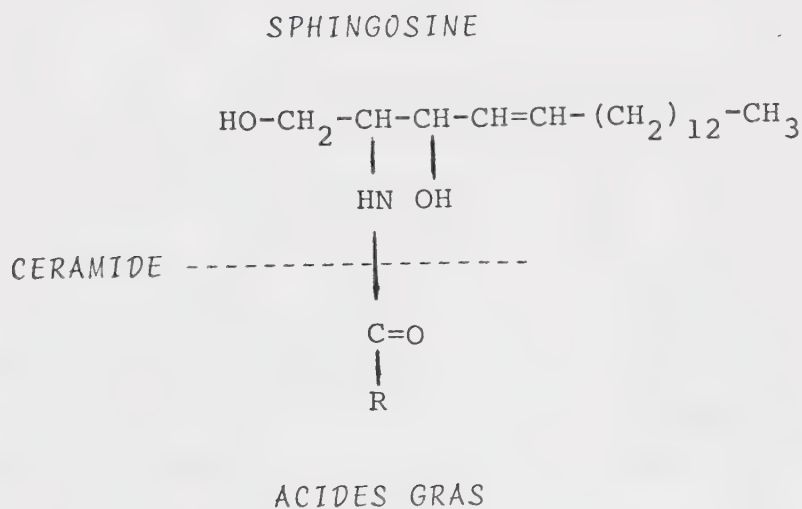
L'hémolyse provoquée par la bêta-toxine est caractérisée par le phénomène de "Hot-Cold" : l'hémolyse est absente ou incomplète à 37°, mais apparaît ou augmente par une post incubation à 4°. Diverses explications ont été apportées à ce phénomène.

WISEMAN (180) ayant pu montrer qu'une modification du pH et de la concentration en Chlorure de Sodium d'une suspension de globules rouges de mouton traitée par la bêta-hémolysine augmentait la lyse, suggère qu'un abaissement de la température pourrait, de la même manière, déterminer une contraction.

- MECANISME D'ACTION -

Selon BERNHEIMER, c'est la toxine cytolytique par excellence puisque son activité est à la fois enzymatique et toxique (13).

L'étude des surnageants d'érythrocytes traités par la bêta-hémolysine par DOERY (41) a révélé la présence d'acide phosphorique qu'il a attribuée à la lyse de la sphingomyéline, glycosphingolipide présent dans la membrane de la plupart des cellules chez les mammifères dont il représente 15 à 50 % des phospholipides (120, 116). La bêta-toxine hydrolyse peu ou pas les autres phospholipides (lysophosphatidyl choline, phosphatidyl-éthanolamine ...). Elle hydrolyse rapidement la sphingomyéline en présence de Mg^{++} et donne de la N-acétyl-sphingosine et de la phosphoryl-choline. C'est donc une sphingomyéline choline phosphoro-hydrolase et elle a reçu le nom de sphingomyélinase C.



- Figure 2 -

Structure de la
N-acétyl-sphingosine (céramide)

MAHESWARAN (113) a étudié la cinétique de l'hydrolyse de la sphingomyéline et a montré que la libération de l'acide phosphorique était maximum à la température de 41° et que, pour une température constante, elle était proportionnelle à la concentration de la bêta-toxine.

MEDUSKI, en 1972 (119), étudiant l'action lytique des ions I_3^- sur les érythrocytes, montre qu'ils se lient avec les groupes N $(CH_3)_3$ de divers phospholipides, et particulièrement avec ceux de la sphingomyéline, en donnant lieu à une réaction "Hot-Cold". Il note également que la différence de sensibilité des globules rouges d'espèces différentes concerne à la fois la bêta-hémolysine et les I_3^- , tandis que WISEMAN (181) et BERNHEIMER (17) remarquent qu'il existe une stricte corrélation entre le taux de sphingomyéline de la membrane des érythrocytes et leur sensibilité à l'action de la bêta-toxine.

L'hémolyse "Hot-Cold" représente une réponse, parmi d'autres, aux agents capables de modifier les groupements des phospholipides, et en particulier de la sphingomyéline. La bêta-hémolysine, par son activité sphingomyélinasique, en est une. Les charges positives de la sphingomyéline déterminent la libération de l'hémoglobine à travers la membrane. A 37°, il s'établit un équilibre de la lyse, mais le refroidissement détruit cet équilibre et augmente la lyse (119).

MOLLBY a suggéré récemment (120) une autre interprétation du phénomène. L'action de la sphingomyélinase produit une membrane déplétée en sphingomyéline, mais gardée néanmoins stable grâce à l'inter réaction entre les ions bivalents (Mg^{++}) et les autres composants membranaires (protéines et glycophospholipides).

L'abaissement de la température détruit cette stabilité, la perméabilité sélective de la membrane est modifiée et la lyse se développe (120).

Au cours de cette même étude, MOLLBY a démontré que la membrane déplétée en sphingomyéline est plus particulièrement sensible à l'action des autres toxines staphylococciques, ce qui est d'importance pour le mode d'action de ces toxines in vivo.

1.3. LA DELTA-HEMOLYSINE

WILLIAMS et HARPER, en 1947, mettent en évidence dans une culture de *Staphylococcus aureus* une hémolysine qui n'est inhibée ni par le sérum anti-alpha-toxine, ni par le sérum anti-bêta-toxine. MARKS (118) ensuite, confirmant l'existence de la delta-toxine, précise son identité et met en évidence sa large activité hémolytique.

- PRODUCTION -

WILLIAMS et HARPER ayant rapporté que la production n'était pas possible en milieu liquide mais ne demandait pas la présence d'oxyde de carbone, la technique de culture sur cellophane-agar proposée par ELEK a été utilisée successivement par JACKSON (86), PLOMMET (131), HALLANDER (72), CAIRD et WISEMAN (26).

Néanmoins, YOSHIDA (187), en utilisant le milieu CCY défini par GLADSTONE (63), obtient des résultats satisfaisants et, par la suite, des milieux semi-synthétiques à base d'extrait de levure et d'hydrolysats de caséine sont utilisés dans les différentes études conduites par HEATLEY (77), KANTOR (89), KREGER (102), KAPRAL (95) ; mais une aération bien contrôlée reste un facteur essentiel de réussite.

De nombreuses souches de staphylocoques sont susceptibles de donner de la delta-hémolysine (cf tableau N° VII). CLECNER et SONEA (32) ont avancé que la capacité de synthétiser la delta-hémolysine serait liée à une conversion lysogénique.

- PURIFICATION -

Différentes méthodes de purification ont été proposées : chauffage, précipitation, extraction aux solvants organiques, chromatographie ou ultracentrifugation, mais toutes n'aboutissent pas à une toxine parfaitement pure, et il semble que celle-ci ne puisse résulter que de l'utilisation combinée de plusieurs méthodologies. Seul YOSHIDA obtient une toxine cristallisée.

Le tableau N° VII résume les différentes techniques de purification.

- CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES -

La delta-hémolysine purifiée est décrite par HALLANDER (72) comme une macromolécule de structure hétérogène, stable à la chaleur, sensible à l'action de la trypsine.

L'activité hémolytique de la delta-toxine n'est pas inhibée par l'EDTA, ni par le citrate, et elle n'est pas activée par les cations métalliques (86).

MARKS a, le premier, montré que l'inhibition par les protéines sériques est un caractère particulier de la delta-toxine. Les protéines sériques animales aussi bien qu'humaines ont une activité inhibitrice et celle-ci est retrouvée au niveau des différentes fractions électrophorétiques, et plus spécialement vers les lipoprotéines (64, 183, 180).

KAPRAL a montré que les phospholipides naturels, comme la lécithine d'oeuf ou le cardiolipide, ont également un effet inhibiteur et qu'ils n'altéraient pas directement la delta-hémolysine, mais qu'ils interviendraient dans sa liaison avec la membrane érythrocytaire (92).

L'inter réaction delta-hémolysine - acides gras saturés dépend de leur nature. Les acides gras avec chaîne de 13 à 19 C augmentent l'hémolyse en favorisant la liaison toxine/cellules, tandis que ceux avec chaîne de plus de 21 C inhibent l'hémolyse par un processus d'interférence (96).

- TABLEAU VII -

*Purification de la delta-hémolysine
(d'après WISEMAN)*

REFERENCE	SOUCHE	METHODE	U.H./mg
JACKSON.....	1363-2426 2428-2429	A, B, C	3.200
YOSHIDA.....	Foggie	A, B, C, C, D, D A, D, D	120 400
CAIRD et WISEMAN....	E-delta	B, B, D, D	12.000
KREGER.....	Wood 46 M	D	400
HEATLEY.....	186	A, B, C, C, C, B	250-300
KAPRAL.....	PG 114	E, B	400
KAUTOR.....	Wood 46 M	D	75

A = chauffage ;

B = précipitation ;

C = extraction par solvant organique ;

D = chromatographie échangeuse d'ions ;

E = ultrafiltration.

La structure hétérogène de la delta-toxine a été confirmée et deux ou trois fractions ont été mises en évidence. Le tableau N° VIII donne quelques caractéristiques de la delta-hémolysine d'après différentes études.

La delta-toxine obtenue par CAIRD et WISEMAN, qui semble homogène selon certains critères, révèle cependant deux composants à l'ultracentrifugation. L'analyse de cette delta-toxine a montré que l'acide aminé N-terminal était la proline (26).

HEATLEY, dans son étude de la composition en acides aminés de sa delta-toxine, a noté des taux élevés de lysine, acide aspartique et d'iso-leucine, mais l'absence de proline, cystine, arginine et tyrosine (77), et BERNHEIMER a confirmé que les deux fractions de bêta-hémolysine avaient la même composition acides aminés (13).

- TOXICITE -

Les données concernant la toxicité de la delta-hémolysine sont peu nombreuses et divergentes. Dénuée de tout pouvoir léthal pour la souris en injection intraveineuse selon GLADSTONE, la D.L. 50 a été évaluée par KREGER à 2 mg et par WADSTROM à 125 mg. Ces résultats doivent être interprétés en fonction de la pureté de la toxine essayée, et le pouvoir dermo-nécrotique observé parfois peut être attribué à des contaminations par l'alpha-toxine.

Le pouvoir cytotoxique de la delta-hémolysine s'exerce sur les leucocytes de nombreuses espèces (homme, lapin, souris, cobaye), il se traduit par une lyse complète

- TABLEAU VIII -

Caractères physico-chimiques de la delta-hémolysine
(d'après WISEMAN)

REFERENCE	DELTA- HEMOLYSINE CONCENTRATION	P. I.	P. M.	S
YOSHIDA.....	0,4 %		6,8 x 10 ⁴ 7,4 x 10 ⁸	6,1
HALLANDER.....			>2 x 10 ⁵	-
MOLLBY et WADSTROM....		9,6	-	-
MAHESWARAN.....		(I) 3,32 (II) 3,75 (III) 8,45	-	-
CAIRD et WISEMAN.....	6,0 mg/ml	-	>2 x 10 ⁵	2,8 9,8
KREGER.....	0,6 %	(I) 9,5 (II) 5,0	-	1,9 4,9 11,9
KANTOR.....		(I) 4,65 (II) 6,70 (III) 9,00	1,03 x 10 ⁵ 1,05 x 10 ⁵	6,04
HEATLEY.....	6,0 mg/ml	-	-	4,9

et s'exerce aussi vis-à-vis des lymphocytes et des macrophages sanguins. GLADSTONE a également montré que les cellules mises en culture en présence de delta-toxine, comme les Hela ou des fibroblastes de poulet, sous l'action de la delta-toxine présentaient des altérations dues à l'action cytopathogène de celle-ci (83, 63, 181).

HALLANDER a confirmé que, au cours des étapes de purification, l'activité hémolytique restait accompagnée d'une activité antibiotique, ce qui suggérait que les deux activités étaient associées à la même molécule ou à des molécules très voisines (72).

HOFFMAN (80) a noté l'activité toxique de la delta-hémolysine sur les bactéries et a mis en évidence une activité inhibitrice de la croissance de germes Gram positifs : *Gaffkya tetragena*, *Micrococcus lysodeikticus*, de certaines souches de *Staphylococcus aureus*.

THELESTAM (162), dans son étude de l'action des toxines staphylococciques sur les cellules diploïdes humaines à l'aide de marqueurs cytoplasmiques (nucléotides), a montré que la delta-toxine attaquait la membrane cellulaire, ce qui s'accompagnait de modifications morphologiques et de l'augmentation de la perméabilité de la membrane. Le dommage cellulaire est plus grand que celui déterminé par l'alpha et la bêta-toxine. Il est rapide et indépendant de la toxine.

L'action antimitochondriale de la delta-toxine a été bien étudiée par RAHAL (136). Le mécanisme d'inhibition de la respiration et de la phosphorylation, qui aboutit à la lyse des mitochondries, rapproche son action de celle de l'entérotoxine B.

La delta-toxine possède un large spectre hémolytique. Les hématies de nombreuses espèces sensibles à son action montrent une sensibilité moindre vis-à-vis des autres toxines staphylococciques. Les espèces concernées sont, dans l'ordre de sensibilité : l'homme, le singe, le lapin, le mouton, le boeuf, le cobaye, le cheval. Il y a une relation linéaire entre le degré d'hémolyse et la concentration en delta-hémolysine entre les limites de 15 à 75 % de lyse. La relation temps/hémolyse est caractéristique de la delta-toxine. L'hémolyse est extrêmement rapide, elle commence dans les 30 secondes qui suivent la mise en contact et 70-80 % de la totalité de la réaction hémolytique sont accomplis en 8 minutes (86, 72, 96). KREGER a observé qu'il existait une synergie entre la delta et la bêta-hémolysine sur les hématies de mouton.

- MECANISME D'ACTION -

Le mode d'action de cette toxine, malgré les études récentes qui lui ont été consacrées, n'est pas encore entièrement élucidé.

WISEMAN et CAIRD (183) ont montré que la delta-toxine a une activité phospholipasique C, agissant préférentiellement sur le phosphatidyl inositol et, à moindre titre, sur la phosphatidyl sérine, phospholipides présents dans la membrane des érythrocytes. Cette activité phospholipasique, mesurée par le phosphore libéré, était trouvée en corrélation avec l'activité hémolytique. Cependant, la cinétique de l'hémolyse ne correspond pas à une lyse de nature enzymatique.

Ces résultats n'ont d'ailleurs pas été confirmés par KREGER (103), ni par KAPRAL (94), ni par RAHAL (136, 137).

La delta-hémolysine diffère donc des alpha et bêta-hémolysine par sa thermostabilité, son caractère plus hydrophobe, sa sensibilité à l'action d'inhibiteurs sériques, sa large action hémolytique et son absence apparente d'activité antigénique.

1.4. LA GAMMA-HEMOLYSINE

La gamma-hémolysine a été décrite pour la première fois par SMITH et PRICE en 1938 (150). MARKS, en 1951, a confirmé son existence (117). Contestée par ELEK (48), son individualité est reconnue par JACKSON en 1963 (82). GUYONNET et PLOMMET (70, 71, 18) proposent des méthodes de production et de purification partielle. TAYLOR et BEIRNHEIMER (160), MOLLBY et WADSTROM (122), en précisent les propriétés physico-chimiques et, récemment, FACKRELL et WISEMAN (50, 51) ont étudié la toxicité et le mode d'action d'une gamma-hémolysine purifiée.

- PRODUCTION -

Tous les essais de production de gamma-hémolysine ont été faits avec la souche SMITH 5R issue de la souche de staphylocoque, isolée par SMITH et PRICE, qui ne produit ni alpha, ni delta-hémolysine. PLOMMET a noté que 23 des 43 souches de staphylocoques testées par lui produisaient de la gamma-hémolysine.

La production de gamma-hémolysine à un titre élevé exige des conditions de culture très précises.

La culture en milieu solide ou semi-solide donne des résultats décevants et explique l'échec de ELEK.

FACKRELL obtient une production intéressante par culture sur feuilles de cellophane selon la technique de BIRCH-HIRSCHFELD avec différents milieux gélosés (DOLMAN-WILSON, GLADSTONE). Cette méthode de culture ne permet cependant que la production de petits volumes de toxine.

La culture en milieu liquide a été proposée par PLOMMET et BOUILLANNE. Le milieu CCY de GLADSTONE, amélioré par

eux, leur ont donné des résultats intéressants (70). C'est un milieu complexe à base d'hydrolysate de caséine et d'extrait de levure, tamponné et enrichi en acides aminés.

Mais le milieu EGY de BEZARD et PLOMMET comportant de la protéase peptone, un dialysat d'extrait de levure, permet la culture en fermenteur et facilite la purification de la toxine (18).

MOLLBY, utilisant un milieu simple à base d'hydrolysate de caséine, obtient de la gamma-hémolysine, mais avec un rendement très inférieur.

L'entretien de la souche est un point délicat et, en pratique, des subcultures sont indispensables à l'obtention d'un titre hémolytique élevé. Cependant, les conditions de culture permettant une production optimale ne sont pas clairement définies. Les conditions d'aération sont critiques. PLOMMET obtient des taux maxima en incubant sous agitation avec un mélange à 20 % de gaz carbonique dans l'oxygène, alors que MOLLBY ne juge pas indispensable l'aération de la culture, mais en culture sur cellophane c'est le mélange CO_2 10 % - air - qui apparaît favorable. Le rôle favorisant du CO_2 n'est pas clair et, d'après FACKRELL, n'est pas expliqué par un abaissement du pH. D'ailleurs la pousse et la production d'hémolysine ne sont pas affectées au même degré par les variations de CO_2 et pH. Pour une bonne production, le pH de la culture doit rester dans des limites de 6,8 à 7,4.

La gamma-hémolysine est formée à la fin de la phase exponentielle de croissance et est libérée dans le milieu, dans sa totalité.

- PURIFICATION -

Différentes méthodes de purification permettent l'obtention de gamma-hémolysine de haute activité. Elles sont résumées dans le tableau N° IX.

REFERENCE	SOUCHE	METHODE	ACTIVITE sur G.R. HUMAINS
GUYONNET	SMITH 5R	Hydroxylapatite	4.000 U.H./mg
MOLLBY	SMITH 5R	DEAE Sephadex A25	640 U.H./ml
TAYLOR	SMITH 5R	Ultrafiltration Hydroxylapatite	4.000 U.H./mg
FACKRELL	SMITH 5R	Ultrafiltration Sephadex G75 Extraction par NaCl Relargages	10^5 U.H./mg

L'hydroxylapatite sépare deux fractions protéiques, gamma I et gamma II de PLOMMET, I et II de TAYLOR, non hémolytiques séparément, mais agissant en synergie sur les hématies d'homme, lapin, mouton, mais sans action sur celles de cheval. Seule la fraction gamma I est thermolabile, mais l'une et l'autre sont inhibées par l'agar.

L'existence de ces deux fractions semble liée à l'utilisation de l'hydroxylapatite puisque, lorsque d'autres échangeurs d'ions sont utilisés, elles ne sont pas retrouvées.

La méthode de purification proposée par FACKRELL, très complexe, permet l'obtention avec un rendement élevé d'une hémolysine hautement purifiée.

- CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES -

La gamma-hémolysine est constituée par une ou deux fractions protéiques sensibles à l'action de la pronase et inactivées par la chaleur (56°, 10 minutes).

Les différents degrés de pureté des échantillons étudiés expliquent les divergences qui apparaissent dans les résultats obtenus et qui sont présentes dans le tableau N° X.

REFERENCE	NOMBRE PICS PROTEIQUES	P.M. gel fil- tration	P.I.	ABSORPTION		U.C.	EXTINCTION E 1 % 280 nm
				CMC	DEAE		
MOLLBY	1		9,5	-	+		
TAYLOR	2	I 29.000	9,8	-	-		
		II 26.000	9,9				
FACKRELL	1	45.000	6,0			2,65	28,35

Dans leur étude, FACKRELL et WISEMAN ont comparé les propriétés d'une gamma-hémolysine purifiée à celles des alpha, bêta et delta-hémolysines également purifiées. L'analyse électrophorétique en gel de polyacrylamide ne permet pas de les distinguer, et certains de leurs caractères sont voisins. L'ensemble des résultats de cette étude figure dans le tableau N° XI.

*Caractères physico-chimiques de la gamme-hémolysine
(d'après FACKRELL)*

Constante de sédimentation.....	2,6
Coefficient d'extinction 1 % 280 nm.....	28,35
Poids moléculaire par gel filtration....	45.000
Point isoélectrique.....	6,0
Acide aminé N-terminal.....	Méthionine

L'analyse des acides aminés présents dans la molécule a montré qu'elle contenait un nombre important de résidus d'acides aspartique et glutamique comme les alpha, delta et bêta-hémolysines, mais que la cystéine n'y était pas détectable.

L'acide aminé N-terminal est la méthionine qui n'est présente d'ailleurs qu'en petite quantité dans la molécule. Le tableau N° XII donne la composition en acides aminés de la gamma-hémolysine staphylococcique.

- TABLEAU XII -

*Analyse des acides aminés de la gamma-hémolysine
(d'après FACKRELL)*

ACIDES AMINES	COMPOSITION (résidus/1.000 acides aminés résidus)
Acide aspartique.....	142,0
Thréonine.....	68,0
Sérine.....	77,4
Acide glutamique.....	102,4
Proline.....	50,2
Glycine.....	125,0
Alanine.....	63,2
Valine.....	51,0
Méthionine.....	3,5
Isoleucine.....	44,4
Leucine.....	57,8
Tyrosine.....	30,6
Phénylalanine.....	35,8
Lysine.....	78,4
Histidine.....	27,2
Arginine.....	38,6

- TOXICITE DE LA GAMMA-HEMOLYSINE -

L'effet léthal sur animal a été étudié et comparé à celui des autres toxines staphylococciques.

Des doses de 0 à 100 μg sont sans effet sur la souris pour qui seule l'alpha-toxine est toxique (150, 51). Injectée par voie intra-péritonéale, la gamma-hémolysine est sans effet sur le cobaye qui, par contre, est tué instantanément par une dose de 50 μg intracardiaque (51).

La toxicité de la gamma-hémolysine par voie intraveineuse chez le lapin a été reconnue par SMITH et PRICE ; le pouvoir dermo-nécrotique de cette toxine, aussi bien chez le lapin que chez le cobaye, s'est montré faible : 100 fois inférieur à celui de l'alpha-toxine (151).

La gamma-hémolysine apparaît en proportion de son activité hémolytique, moins toxique que l'alpha-toxine.

L'étude de la cytotoxicité de la gamma-hémolysine sur les leucocytes humains a montré que, en présence de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de toxine, toutes les cellules sont lysées en 10 minutes, alors qu'avec la même dose d'alpha-toxine la lyse complète n'est obtenue qu'après 30 minutes (151).

L'action in vitro de la gamma-hémolysine sur le granulocyte de lapin a été évaluée selon la technique de SZMIGIELSKI (115) qui mesure le dommage cellulaire à la quantité d'enzymes intracellulaires libérée. La gamma-hémolysine détermine une libération de phosphatase acide et de lysozyme qui correspond à une destruction préférentielle des lysosomes, semblable à

celle exercée par l'alpha-hémolysine mais nécessitant des concentrations dix fois supérieures.

L'activité lytique de la gamma-hémolysine est étudiée par le test d'exclusion du bleu trypan sur cellules CG et s'est révélée importante (85 % cellules bleues) (151).

L'activité hémolytique de la gamma-hémolysine s'exerce spécialement sur les hématies de l'homme, du lapin, du mouton, mais les hématies d'autres espèces sont sensibles (tableau N° XIII).

Dans le spectre hémolytique des différentes hémolysines du staphylocoque, l'activité anti-globules rouges humains de la gamma-hémolysine confère à celle-ci une place particulière.

L'étude approfondie de la cinétique de lyse des hématies humaines a montré dans l'expérimentation de FACKRELL que l'adjonction de membrane érythrocytaire ou de ses phospholipides inhibe la lyse, alors que le cytoplasme ou la protéine membranaire exempte de lipides restent sans effet.

- MECANISME D'ACTION -

Le mode d'action de la gamma-hémolysine sur la membrane cellulaire est encore mal connu.

L'étude du surnageant de membrane érythrocytaire montre que l'incubation de celle-ci avec la gamma-hémolysine libère de l'azote et de l'acide phosphorique. Le taux d'azote libéré reste inférieur à celui obtenu lors d'une incubation avec la pronase. Par contre, la protéine exempte de lipides isolée de la membrane érythrocytaire, incubée avec la gamma-hémolysine, ne libère

- TABLEAU XIII -

*L'activité hémolytique de la gamma-hémolysine
(d'après FACKRELL)*

	ACTIVITE (U.H./mg protéine)
Lapin.....	113.210
Chien.....	29.764
Rat.....	44.041
Chat.....	6.445
Mouton.....	89.906
Souris.....	25.754
Poulet.....	306
Cobaye.....	6.620
Homme.....	44.041
Singe.....	3.208
Pigeon.....	160

pas d'azote. Le taux d'acide phosphorique libéré par la membrane est de l'ordre de celui résultant de l'action de la phospholipase C. Aussi, bien que les phospholipides extraits de la membrane érythrocytaire ne libèrent pas d'acide phosphorique par incubation avec la gamma-lysine, FACKRELL suggère que la gamma-lysine pourrait être une phospholipase. L'inhibition compétitive de la lyse par les phospholipides membranaires pourrait en être une confirmation, tandis que l'on pourrait expliquer l'absence d'action sur les phospholipides membranaires par une altération consécutive à l'extraction.

Sa sensibilité à un certain nombre d'inhibiteurs permet de la distinguer des autres hémolysines. Elle est inhibée par l'EDTA et exige la présence d'ions sodium pour développer son action lytique.

L'inhibition par les polymères sulfonés tels que l'agar (71), l'héparine, le sulfate de dextran (160), est à associer à une liaison entre la toxine basique et les groupements acides polymères.

Comme la streptolysine O, la gamma-hémolysine est inhibée par le cholestérol, quoique par un mécanisme différent dans lequel n'intervient pas le groupe 3-bêta-hydroxyl du cholestérol (160).

D'autres lipides inhibent la gamma-hémolysine : les lecithines, le cardiolipide, les phosphatidyl et les acides gras (tableau N° XIV).

En résumé, le mode d'action précis de la gamma-hémolysine, encore mal élucidé, pourrait être de type enzymatique et son activité s'exercer sur la forme d'une phospholipidase.

- TABLÉAU XIV -

*Inhibition de la gamma-hémolysine par les lipides
(d'après TAYLOR)*

	(mg/15 U.H./ml)
Lécithine (préparation 1).....	100
Lécithine (préparation 2).....	80
Phosphatidyl éthanolamine.....	140
Phosphatidyl sérine.....	5
Phosphatidyl inositol.....	0,15
Phosphatidyl glycérol.....	0,25
Diphosphatidyl glycérol (cardiolipine)..<	0,05
Sphingomyéline.....	140
Acide stéarique.....	3
Acide palmitique.....	4
Acide nervonique.....	1

1.5. L'EPSILON-HEMOLYSINE

L'existence d'autres hémolysines staphylococciques a été suggérée par ELEK (48) qui fait l'observation d'une hémolysine responsable d'une zone d'hémolyse caractérisée de "large" chez 95 % des staphylocoques coagulase négatifs étudiés. Cette aptitude à la production d'epsilon-hémolysine a été contestée et KLECK (100) a montré que l'epsilon et la bêta-hémolysine ne faisaient qu'un.

Cependant, en 1972, ALI et ses collaborateurs décèlent dans un filtrat de culture de *Staphylococcus epidermidis* une hémolysine qui se distingue électrophorétiquement des hémolysines déjà connues et lyse les hématies humaines et de lapin. Ils l'identifient comme l'epsilon-hémolysine et suggèrent que *Staphylococcus epidermidis* pourrait sécréter d'autres hémolysines dont le rôle reste à déterminer (2).

Cette étude n'est pas confirmée par celle de WADSTROM qui affirme que *Staphylococcus epidermidis* ne produit habituellement que de l'alpha et de la delta-toxine (173).

1.6. TABLEAUX RECAPITULATIFS

Dans les trois tableaux récapitulatifs suivants, nous avons fait figurer les principales caractéristiques des hémolysines alpha, bêta, delta et gamma.

*Comparaison de quelques propriétés des hémolysines staphylococciques
(d'après WISEMAN)*

PROPRIETES	ALPHA	BETA	DELTA	GAMMA
Constante de sédimentation.....	14,3	1,8	2,8 ; 9,8	2,6
Coefficient d'extinction.....	13,56	4,24	29,08	28,35
P.M. (gel filtration)	$4,5 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$	2×10^5	$4,5 \times 10^8$
Point isoélectrique..	8,5	9,5	9,6	6
Acide aminé N-terminal	Histidine	-	Proline	Méthionine
Sensibilité des érythrocytes.....	Lapin Chien	Mouton Boeuf	Homme Cheval	Homme Lapin
Exigence en cations..	-	Mg ² CO ² Mn ²	-	Na ⁺ K ⁺
Inhibition par EDTA..	-	+	-	+
Inhibition par phospholipides...	+	+	+	+
Activité de surface..	+	?	+	?

Tableau récapitulatif : Composition en acides aminés
des hémolysines alpha, bêta, delta, gamma, staphylococciques
(d'après FACKRELL)

ACIDES AMINES	COMPOSITION (résidus/1000 résidus d'acides aminés)			
	ALPHA	BETA	DELTA	GAMMA
Acide aspartique....	121,2	135,1	164,1	142,0
Thréonine.....	56,9	53,8	119,9	68,0
Sérine.....	65,1	98,7	96,3	77,4
Acide glutamique....	93,0	116,9	66,4	102,4
Proline.....	81,2	-	14,0	50,2
Glycine.....	170,1	121,2	112,4	125,0
Alanine.....	75,8	78,2	75,2	63,2
Valine.....	50,1	57,8	76,0	51,0
Cystéine.....	-	12,2	-	-
Méthionine.....	12,1	-	-	3,5
Isoleucine.....	40,4	52,5	102,7	44,4
Leucine.....	46,0	58,8	61,2	57,8
Tyrosine.....	33,5	6,3	9,3	30,6
Phénylalanine.....	28,3	41,4	53,5	35,8
Lysine.....	70,9	98,0	24,3	78,4
Histidine.....	20,0	24,8	3,5	27,2
Arginine.....	34,5	39,6	21,4	38,6

*Activité hémolytique
des toxines alpha, bêta, delta, gamma, staphylococciques*

U.H./mg PROTEINE	ALPHA	BETA	DELTA	GAMMA
> 100.000		Mouton		Lapin
> 10.000 ≤ 100.000	Lapin	Lapin Cobaye Homme		Mouton Homme Rat Chien Souris
> 1.000 ≤ 10.000	Chien Rat Chat Mouton Souris	Souris Pigeon Rat Chat Poussin	Homme Cheval Mouton Souris Lapin Rat Chat	Singe Chat
> 100 ≤ 1.000		Chien Singe	Poussin Cobaye Chien Singe Pigeon	Poussin Pigeon
≤ 100	Poussin Cobaye Homme Singe Pigeon			
0	Cheval	Cheval		Cheval

2.

ROLE DES HEMOLYSINES
DANS LE POUVOIR PATHOGENE DU STAPHYLOCOQUE

Les souches virulentes de staphylocoques produisent enzymes et toxines en grande quantité in vitro, mais il n'est pas définitivement prouvé que ces substances soient formées dans les tissus de l'hôte pendant l'infection, et leur rôle dans le développement de l'infection et de l'immunité reste obscur.

La production de coagulase par une souche de staphylocoque a été classiquement associée à sa pathogénicité, mais, en fait, l'activité in vivo de la coagulase est mal connue et l'on a pu reconnaître comme étant virulentes des souches coagulase négatives.

On a suggéré que la production d'alpha-toxine constitue un autre critère de virulence. Selon LACK (107), BURNS (23) et NOBLE (124), le caractère pathogène du germe est lié à l'ensemble de toxines et enzymes sécrétées par lui et non à la présence d'une seule.

Divers protocoles expérimentaux chez l'animal, imaginés par FOSTER (54) et par KAPRAL (91, 93), apportent la preuve de la production d'alpha et bêta-toxine in vivo, bien que la place de l'alpha-toxine dans l'activité létale du staphylocoque chez la souris soit mise en doute par BARTELL (12).

Chez l'homme, les souches isolées de suppurations libèrent plus de toxines que celles isolées de porteurs sains (19), et les staphylocoques coagulase positifs produisent de hauts titres en alpha-hémolysine alors que les souches coagulase négatives sont non hémolytiques.

ELEK et LEVY (48) ont montré que 96 % des staphylocoques coagulase positifs sécrètent de l'alpha-hémolysine, 11 % de la bêta-hémolysine et 97 % de la

delta-hémolysine. La combinaison alpha-delta-hémolysine est donc la plus fréquente chez l'homme, alors que chez l'animal, c'est la combinaison alpha-bêta-delta qui est habituelle avec la présence prédominante de la bêta-hémolysine (88 %).

Il a été montré récemment que certaines souches de *Staphylococcus epidermidis* possédaient des propriétés propres à *Staphylococcus aureus*, et en particulier sécrétaient de la delta-hémolysine (52). GRIGOROVA, dans son observation, en trouve 50 à 67 % selon le biotype chez les malades, 50 à 83 % chez les porteurs sains, ce qui ne fait pas ressortir de différence entre les deux populations (69).

Une étude conduite par PIOTROWSKA en 1975 (130), portant sur la fréquence de la production des toxines par les staphylocoques isolés en clinique, a confirmé la fréquence de la production de l'alpha-hémolysine (82 %). Mais la plupart des souches produisent deux ou trois toxines. Une souche qui ne produit qu'une seule hémolysine sécrète de l'alpha-toxine. Une corrélation a été trouvée entre le nombre de toxines produites et la sécrétion de pénicillinase, ainsi que la résistance au chloramphénicol, à l'érythromycine et à la méthicilline.

De cette étude, il ressort également que les germes aptes à produire plusieurs toxines sont moins sensibles à l'action des phages.

Le tableau N° XV montre la fréquence de production de différentes toxines par les staphylocoques pathogènes selon leur origine (d'après PIOTROWSKA).

- TABLEAU XV -

Production de toxines par les staphylocoques coagulase positifs d'origines diverses
(d'après PIOTROWSKA)

SOURCE	SOUCHES		ENTEROTOXINES								(TOTAL)		STAPHYLO- KINASE		ALPHA- HEMOLYSINE	
	Nb		ABC ₁	A B	AC ₁	BC ₁	A	B	C ₁	Nb*	%	Nb	%	Nb	%	
Sang.....	50		0	6	0	1	4	9	1	21	42,0	29	58,0	33	66,0	
Expectorations...	32		2	4	2	2	5	1	3	19	59,3	23	71,8	30	93,7	
Pus - peau.....	45		0	4	1	1	2	1	12	21	46,6	34	75,5	35	77,7	
Liquides biologiques.....	153		7	12	8	10	16	7	20	80	52,3	116	75,8	131	85,6	
Lait.....	30		0	1	1	4	1	7	3	17	56,6	15	50,0	25	83,3	
Total.....	310		9	27	12	18	28	25	39	158	51,0	217	70,0	254	82,0	

* = nombre de souches produisant des toxines;

La résistance aux antibiotiques et la sécrétion des toxines extra-cellulaires sont reconnues être, chez les entérobactéries, sous le contrôle des plasmides (151, 152). Il a été montré que la résistance aux antibiotiques du *Staphylococcus aureus* l'était également (105, 126). Chez un certain nombre de *Staphylococcus aureus* isolés d'affections humaines sévères, WHITE vient de montrer que la production d'alpha-hémolysine était contrôlée par une plasmide, comme l'est l'exfoliatine (176).

La question reste actuellement posée de savoir s'il existe des souches de staphylocoque associées à certaines manifestations pathologiques : furoncle, septicémie, pneumonie, ostéomyélite ... L'étude faite par ABRAMSON ne fait ressortir qu'un type d'infection staphylococcique puisse être rattachée à une souche "spécifique". Cependant, ABRAMSON a pu distinguer trois groupes d'infections, cutanées, systémiques et respiratoires, qui pouvaient être corrélés avec une activité extra-cellulaire, mais celle-ci était une activité hyaluronidasique et non hémolytique (1).

Récemment, VYMOLA, en faisant le bilan de ses observations tant expérimentales que cliniques, peut affirmer que l'alpha-toxine ne joue pas de rôle pathogène dans les affections staphylococciques chroniques (169). JOHNSON n'attribue qu'un rôle secondaire à l'alpha-toxine dans la détermination des lésions produites par le staphylocoque, et FOSTER n'en reconnaît aucun dans le développement de l'abcès aigu staphylococcique (87, 53).

Par contre, dans certaines localisations, l'une ou l'autre des hémolysines semble pouvoir être impliquée plus directement : la bêta-hémolysine au niveau des

lésions cutanées comme les furoncles, ou la delta-hémolysine dans les ostéomyélites chroniques.

De même, la bêta-hémolysine pourrait participer à la virulence du germe par l'activité enzymatique qu'elle exerce sur la sphingomyéline présente dans de nombreuses membranes cellulaires, la destruction des membranes libérant des métabolites nécessaires à la multiplication de la bactérie.

La delta-hémolysine occupe une place particulière, quoique encore mal cernée, dans la pathogénicité du staphylocoque. In vivo, son activité bactérienne pourrait favoriser la pousse sélective des germes la sécrétant (72) et, dans l'entérite staphylococcique, sa fixation sur la muqueuse, liée à la structure lipidique de celle-ci, ne déterminerait pas des lésions directes, mais, secondairement à une action sur le transport d'ions, inhiberait l'absorption intestinale de l'eau (96).

S'il a été reconnu récemment qu'un pourcentage important de souches de staphylocoque produit de la gamma-hémolysine, peu ou pas de données ont été apportées sur son caractère pathogène, mais la présence d'anticorps anti-gamma-hémolysine dans les ostéomyélites représente une indication intéressante (159).

Très récemment, KUREK a pu suggérer que la gamma-hémolysine jouait un rôle dans la pathogénèse de l'ostéomyélite expérimentale du lapin.

3.

LA REPONSE IMMUNITAIRE
VIS-A-VIS DES HEMOLYSINES STAPHYLOCOCCIQUES

Une immunité naturelle existe vis-à-vis du staphylocoque, qui peut jouer un rôle important dans les mécanismes de défense contre ce germe. Dès 1936, RAMON (139, 138), dans son étude de l'immunisation antistaphylococcique, avait souligné l'existence et l'importance de cette immunité naturelle qui semble apporter une explication à la résistance très remarquable qu'offre l'organisme humain au risque permanent de contamination par le germe omniprésent.

Les mécanismes de l'immunité naturelle, qu'ils soient représentés par l'activité opsonique naturelle ou liés à une infection inapparante, ou à un phénomène d'interférence avec des staphylocoques non virulents, peuvent déterminer chez un sujet la manière dont il développera sa réponse antistaphylococcique, tout au moins celle représentée par les anticorps antitoxiques.

La réponse humorale sous forme d'anticorps variés correspond à la diversité des antigènes staphylococciques. Les anticorps dirigés contre l'alpha-hémolysine ont particulièrement retenu l'attention. RAMON, après avoir transformé la toxine en antitoxine en 1936, montre que l'anatoxine, comme la toxine, entraîne la formation d'antitoxine spécifique (140, 141). Cette production d'antitoxine spécifique varie d'une espèce à l'autre, et d'un individu à l'autre. Le taux peut rester stable ou durable, ou bien diminuer rapidement. L'antitoxine passe la barrière placentaire. Cependant, OTTAVIANI a montré que, dans le sérum de sujets atteints d'ostéomyélite staphylococcique, la réponse spécifique humorale se situait dans la fraction IgM (127), alors que TAYLOR sépare la sépare par chromatographie avec les IgG (159).

RAMON et ses collaborateurs n'ont pas considéré les anticorps antitoxiques comme de simples témoins du passage de l'antigène microbien dans l'organisme, mais comme des éléments de défense, puisqu'ils sont capables de neutraliser, in vivo et in vitro, la toxine dans ses diverses propriétés. Par des études pratiques chez le cobaye et chez le lapin (138), ils ont montré que l'immunité antitoxique s'oppose au développement de l'infection staphylococcique et ils ont confirmé la relation existant entre le taux d'antitoxine provoqué par vaccination et la disparition plus ou moins rapide des manifestations observées en clinique humaine.

A la suite de ces premières observations, on a étudié d'une manière systématique le développement des activités antitoxines dans le sérum du sujet sain ou présentant des staphylococcies, aussi bien cutanées que profondes. Mais ces études ne sont pas arrivées à la conclusion que l'on puisse attribuer systématiquement à ces anticorps une valeur protectrice.

Cependant, EASMON et GLYNN ont repris, en 1975, l'étude de la signification pathogène de l'alpha-toxine et de la valeur protectrice des anticorps autres que l'alpha-toxine (46). Avec un protocole combinant immunisation active et transfert passif d'antitoxine alpha chez la souris, ils ont mis en évidence le rôle protecteur de ces anticorps vis-à-vis des phénomènes de dermo-nécrose. L'analyse des mécanismes inhibiteurs a fait ressortir, en plus de la possibilité d'une action neutralisante spécifique, une réaction antigène-anticorps inductrice d'une inflammation locale par réaction de type Arthus s'opposant à la dermo-nécrose. La même étude a montré que la nécrose déclenchée par des infections staphylococciques répétées est attribuable à une réaction d'H.S.R., mais que lorsqu'une réponse humorale accompagne

la réponse cellulaire, la lésion reste limitée, ce qui signifie qu'une réaction antigène-anticorps empêche l'induction de l'H.S.R., mais les anticorps concernés ne semblent pas être antitoxiques (47, 156, 157).

Les anticorps anti-alpha-hémolysine ont été recherchés dans la population saine (adultes et enfants) et mis en évidence à un taux mesurable faible, comme on peut le voir sur le tableau N° XVI.

Les données de la littérature sur la valeur du taux des anticorps anti-alpha-hémolysine chez les sujets présentant des affections staphylococciques sont nombreuses. Elles concernent des affections profondes, septicémiques, pleuro-pulmonaires ou ostéo-articulaires, mais également des affections cutanées chez les adultes aussi bien que chez les enfants (145). Une élévation du taux d'anti-alpha-hémolysine est mise en évidence dans un certain nombre de cas ; elle correspond à une réaction immunitaire qui, elle-même, est fonction d'un certain nombre de facteurs : virulence de la souche, importance et site de l'infection, et valeur des défenses de l'organisme.

L'immunogénicité de la bêta-hémolysine a été établie par ELEK. Bien qu'elle ne soit pas produite habituellement par les staphylocoques isolés chez l'homme, elle doit être plus fréquemment présente qu'on ne le pense, puisque des anticorps anti-bêta-hémolysine ont été retrouvés par UYEDA dans 100 % des 165 sérums testés et par DONHAUE dans 80 % des 106 que comporte sa série (43, 168).

Le caractère immunogène de la delta-hémolysine admis par ELEK et par KAYSER (98) reste discuté. L'échec dans les immunisations de lapins rencontré par de nombreux

- TABLEAU XVI -

*Taux d'antistaphylolysine alpha chez le sujet sain
(complétée d'après RUBI)*

AUTEURS	NOMBRE DE SUJETS	TITRE (U.I./ml)
BRZEZINSKI.....	790 adultes	≤ 1
SULY.....	500 adultes	0,75
TUNEWALL.....	109 enfants	≤ 2 (76 %)
WIDHOLM.....	400 adultes	≤ 2
LACK.....	245 adultes	≤ 2
KIENITZ.....	638 adultes	$\leq 1,2$
JARRIAULT.....	658 adultes	≤ 2 (99 %)
RUBI.....	450 enfants	≤ 2 (96 %)
QUENEAU.....	350 adultes	≤ 2

expérimentateurs (72, 89, 100) et l'inhibition de la delta-hémolysine par des composants sériques nombreux non immunoglobuliniques (43, 114) ont jeté le doute. Cependant, WISEMAN et ses collaborateurs ont montré qu'il existait une activité anticorps anti-delta-toxine qui demeurerait après extraction des inhibiteurs lipoprotéiques non spécifiques et pouvait être mise en évidence par électrophorèse ou immuno-électrophorèse (183, 49).

SMITH et PRICE (150), puis GUYONNET et PLOMMET (71) et récemment FACKRELL et WISEMAN (51), ont immunisé avec succès des lapins par la gamma-hémolysine. D'autres espèces peuvent être immunisées, mais aucun pouvoir protecteur n'a pu être mis en évidence.

Un taux d'anti-gamma-hémolysine est présent dans le sérum de l'homme sain, et TAYLOR et PLOMMET ont montré que ce taux pouvait s'élever au cours des ostéomyélites staphylococciques. (159).

A la suite de RAMON, la recherche des anti-alpha-hémolysines a d'abord permis de suivre le développement de l'immunité après anatoxithérapie. L'absence d'identification du germe dans les affections bactériennes, à staphylocoque en particulier, pose un problème étiologique. Un examen sérologique peut représenter la solution d'un problème diagnostique difficile.

A la suite d'études nombreuses, on admet que le dosage de l'anti-alpha-hémolysine peut avoir une valeur dans le diagnostic ou la surveillance de staphylococcies à localisation profonde et particulièrement ostéo-articulaire (106, 129, 132, 134). Une élévation franche et confirmée représente un argument en faveur

d'une étiologie staphylococcique puisque, dans l'étude de QUENEAU, 69 % des malades porteurs de staphylococcies bactériologiquement confirmées ostéo-articulaires ou non ont présenté un taux élevé d'anti-alpha-hémolysine (135). Un taux élevé ne représente pas un argument pronostique de gravité, ni d'ailleurs ne correspond à un état de protection ; il indique simplement la mise en oeuvre des mécanismes de défense de l'organisme. Cette réaction dépend, du reste, d'un ensemble de facteurs liés à la souche ou à l'hôte qui sont responsables de l'hétérogénéité de la réponse en anticorps antitoxiques.

Récemment, TAYLOR et PLOMMET ont montré que des titres élevés d'anticorps anti-gamma-hémolysine apparaissaient plus précocement et d'une manière plus significative que ceux d'anti-alpha-hémolysine dans les ostéomyélites et ont avancé que l'élévation des anti-gamma-hémolysines représentait un élément diagnostique important, permettant également d'étudier l'évolution de la maladie et de suivre l'efficacité du traitement (159).

La recherche de deux antitoxines, comme dans la maladie streptococcique, augmenterait la spécificité de l'investigation (161) et celle d'autres types d'anticorps staphylococciques, antibactériophages (88), anti-structures cellulaires (40), pourrait compléter ce bilan de l'infection à staphylocoque.

DEUXIÈME PARTIE

TRAVAUX PERSONNELS .

1.

PREPARATION ET PURIFICATION
DE LA
GAMMA-HEMOLYSINE STAPHYLOCOCCIQUE

I N T R O D U C T I O N :

Les milieux solides ou semi-solides, tel celui utilisé par ELEK en 1950, ne permettent pas d'obtenir de la gamma-hémolysine puisque l'agar en est un inhibiteur, bien qu'en 1976 FACKRELL ait pu décrire une technique de production utilisant un milieu solide ensemencé sur cellophane selon la méthode de BIRCH-HIRSCHFELD.

C'est l'utilisation de milieux liquides qui a permis à PLOMMET et ses collaborateurs, puis à TAYLOR et BERNHEIMER, de produire de la gamma-hémolysine et d'en étudier les propriétés. Notre essai de production a été fait suivant la méthode de BEZARD et PLOMMET. La souche utilisée nous a été fournie par PLOMMET. Elle provient d'un mutant rough d'un staphylocoque humain isolé par ELEK.

1.2. EXPOSE DE LA TECHNIQUE DE PRODUCTION ET DE PURIFICATION UTILISEE

1.2.1. PRODUCTION -

1.2.1.1. Entretien et préparation de la souche :

Pour la production de la gamma-hémolysine, nous avons utilisé la souche R5 de SMITH (150) produisant de la gamma-hémolysine, mais pas de la delta-hémolysine.

L'entretien de la souche 5R de Staphylococcus aureus est certainement le point le plus délicat pour obtenir des productions régulières.

Cette souche, conservée sous forme lyophilisée en ampoules, est remise en suspension dans un bouillon ordinaire, cultivée à l'étuve pendant 4 heures à 37°C et ensemencée sur gélose ordinaire.

Après vérification de sa pureté par une coloration de Gram, on entretient la souche sur gélose au sang pour vérifier son pouvoir hémolytique.

- Gélose au sang de cheval : pas d'hémolyse.
- Gélose au sang de lapin : hémolyse large.
- Gélose au sang de mouton : hémolyse.
- Gélose au sang humain : hémolyse variable.

Les colonies prélevées sur gélose au sang humain à 5 % sont repiquées toutes les 24 heures sur un milieu identique ; de plus, deux géloses ordinaires sont ensemencées en vue d'une lyophilisation pour conserver la souche.

Après plusieurs passages sur gélose au sang humain, nous avons remarqué que les zones d'hémolyse diminuaient. Nous avons réactivé une colonie par passage en gélose glucosée, puis en bouillon ; les colonies montraient alors sur gélose au sang humain une hémolyse plus importante. Ceci confirme le fait publié par GUYONNET et PLOMMET (1970) indiquant que seules les colonies produisant beaucoup de gamma-hémolysine sont isolées sur gélose au sang, car entourées d'une zone de lyse.

Pour éviter de diminuer l'activité hémolytique de la souche, nous avons alors suivi le protocole indiqué par BEZARD et PLOMMET (1973). Pour la conservation et l'entretien des souches, du fait de l'inhibition de l'hémolysine par l'agar, ces auteurs utilisaient l'ionogar N° 2 Oxoïd. Nous l'avons remplacé par l'indubiose A 37 pour quelques-uns de nos essais, mais la gélose était molle et difficile pour l'ensemencement. Nous avons donc utilisé l'agar purifié oxoïd qui ressemble à l'ionogar N° 2 Oxoïd.

- COMPOSITION DE L'IONOGAR N° 2 :

Eau.....	0,2 %
Cendres.....	1,5 %
Cendres insolubles dans les acides.....	0,2 %
Cl.....	0,0 %
N total.....	0,3 %
Phosphate en P_2O_5	0,3 %
Ca.....	0,28 %
Mg.....	0,32 %
Cu.....	8 ppm
Fe.....	170 ppm

- COMPOSITION DE L'AGAR PURIFIE OXOID :

Eau.....	0,2 %
Cendres.....	1,2 %
Cendres insolubles dans les acides.....	0,1 %
Cl en NaCl.....	0,01 %
Phosphate en P_2O_5	0,01 %
SO_4	0,64 %
N total.....	0,09 %
Ca.....	167 ppm
Mg.....	105 ppm
Fe.....	25 ppm

Nous avons également utilisé du sang humain défibriné stérile, sur billes de verre avec agitation 15-20 minutes, en remplacement des globules rouges lavés à 5 % indiqués par BEZART et PLOMMET, et nous l'avons introduit dans le milieu suivant :

- COMPOSITION DU MILIEU DE BASE :

Bacto-tryptase.....	10 g
Extrait de boeuf.....	3 g
NaCl.....	5 g
Agar purifié Oxoid.....	10 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
à pH 7,2.	

Dissoudre les produits à chaud et faire autoclaver 20 minutes à 120°C.

Les colonies présentant l'hémolyse de type gamma : claires, à bords flous, de 1 mm de diamètre, après 24 heures, sont sélectionnées et passées successivement sur le même milieu.

Après 3-4 passages, on ensemence largement un tube de gélose inclinée de composition un peu différente (BEZARD et PLOMMET) et on le laisse incubé pendant une nuit à 37°C.

- COMPOSITION DU MILIEU :

Infusion coeur-cervelle.....	25 g
Agar purifié oxoId.....	10 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

La culture récoltée sur ces tubes peut servir comme souche de départ pour une production pendant un mois ; elle peut également être lyophilisée. Après ce délai, il faut opérer à nouveau comme ci-dessus.

1.2.1.2. Milieux utilisés pour la production de la gamma-hémolysine :

Nos premiers essais ont été effectués sur milieu CCY de GLADSTONE et VAN HEIMENGEN, comme l'indiquaient GUYONNET, PLOMMET et BOUILLANNE.

- COMPOSITION DU MILIEU CCY :

Hydrolysate de caséine.....	40 g
Extrait de levure.....	10 g
B-glycérophosphate de sodium.....	20 g
Lactate de sodium 50 %.....	10 ml
$\text{Na}_2\text{H PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{KH}_2 \text{ PO}_4$	0,4 g
$(\text{NH}_4)_2 \text{ SO}_4$	1 g
D.L. tryptophane.....	80 g
L. cystine.....	100 mg
Thiamine.....	2 mg
Polypropylène glycol P 2000.....	0,05 ml
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

à pH = 7.

- SOLUTION STOCK D'ELEMENTS METALLIQUES :

Mg SO ₄ , 7 H ₂ O.....	0,2 g
Mn SO ₄ , 4 H ₂ O.....	0,1 g
Fe SO ₄ , 7 H ₂ O.....	0,06 g
Acide citrique.....	0,06 g
Eau distillée q.s.p.	100 ml

Le milieu est stérilisé à 120°C, la solution stock d'ions est stérilisée séparément. On ajoutera cette solution au milieu de culture à raison de 10 ml pour 1 litre.

Les résultats n'étant pas satisfaisants avec ce milieu, cela nous a conduit à utiliser le milieu EGY recommandé également par BEZARD et PLOMMET. Ce milieu comporte un dialysat d'extrait de levure Oxoïd. Pour nos premiers essais, l'extrait de levure était ainsi préparé :

Extrait de levure (Oxoïd).....	120 g
Eau distillée.....	85 ml

La dialyse s'effectue pendant 24 heures en boyaux 8/32 Visking d'environ 80 cm de longueur, perméables à l'eau et aux molécules de faible poids moléculaire, de diamètre 24 A°, se stérilisant à l'autoclave et supportant la congélation.

Les boyaux sont introduits dans un cylindre de verre de 1 m x 7 cm contenant 1600 ml d'eau distillée pour 360 g d'extrait de levure, disposé sur un plateau à balancement lent (20 fois par minute, amplitude : 30 cm).

Le dialysat est repris après 24 heures. Pour 1 litre de dialysat, on ajoute 125 g d'hydroxylapatite

lavée en tampon phosphate 0,001 M, pH 6,8. Puis agitation magnétique pendant 30 minutes à la température du laboratoire. On décante sur verre.

Le dialysat dépigmenté peut être conservé quelques jours à 4°C ou congelé ; nous le conserverons à l'état congelé après stérilisation et il sera ajouté au milieu EGY préparé à raison de 200 ml de dialysat pour 1 litre de milieu final.

- COMPOSITION DU MILIEU EGY :

Protéose peptone.....	10 g
B-glycérophosphate de sodium.....	20 g
Solution de lactate de sodium à 60 %...	16,3 ml
Na_2HPO_4 , 12 H_2O	6,25 g
KH_2PO_4	0,4 g
Solution d'acide citrique à 0,32 %.....	2 ml
Dialysat d'extrait de levure dépigmenté	200 ml
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

à pH 6,9.

Antimousse Rhodorsil 426 (Rhône-Poulenc) stérilisée à part.....	0,4 ml
--	--------

La protéose peptone est utilisée à la place de la peptone Evans disparue du marché.

Stérilisation à 120°C dans la cuve du fermenteur.

1.2.1.3. Conditions de culture :

Une souche conservée à 4°C sur gélose inclinée (à base d'infusion coeur-cervelle) est utilisée comme souche de départ et périodiquement purifiée sur gélose

au sang humain à 5 % ; la simple sélection des colonies entourées des zones d'hémolyse les plus larges assure une bonne régularité de la production.

A) EN MILIEU CCY :

Nous effectuons deux précultures successives, comme l'ont indiqué PLOMMET et BOUILLANE (131).

a) Préculture I :

La souche estensemencée dans 10 ml de milieu CCY en flacon de 50 ml avec agitation magnétique vigoureuse pour faciliter l'aération du milieu et incubée à 37°C pendant 3 heures.

b) Préculture II :

La totalité de la préculture I est alors inoculée dans un flacon de 250 ml contenant 50 ml de milieu CCY neuf et cultivée pendant 4 heures à 37°C avec agitation magnétique rotative. Après ce délai, la culture est mise en route.

c) Culture :

Elle est effectuée dans un fermenteur de 2 litres (modèle Biolafitte) contenant 1 litre de milieu au bain-marie à 37°C avec agitation et aération par barbotage d'un mélange CO₂ 25 % + air 75 % (ou CO₂ 25 % + O₂ 75 % dans la technique originale), sous un débit de 6 litres /heure. La vitesse d'agitation et la quantité d'antimousse sont adaptées à chaque toxine et à chaque souche. Pour la toxine gamma avec la souche R5, il faut une agitation moyenne créant une petite dépression sur la surface du liquide d'environ 700 t/min. On a employé 1 ml d'antimousse Rhodorsil 426 (Rhône-Poulenc), stérilisé et ajouté après stérilisation du milieu.

Après 16 heures de culture, celle-ci est arrêtée (parce que la toxine gamma diminue ensuite et finit par disparaître totalement).

Le jus de culture est centrifugé une demi-heure à 4000 t/min et on vérifie le titre de toxine obtenue, puis le surnageant est mis en dialyse 48 heures contre du tampon phosphaté à 0,1 M, pH 6,8, deux fois, puis à 0,005 M, pH 6,8, encore deux fois.

La solution de tampon 0,005 M peut être lyophilisée directement ou congelée à -30°C pendant 2-3 mois.

B) EN MILIEU EGY :

a) Préculture I :

La souche récoltée sur gélose inclinée comme précédemment est ensemencée dans 50 ml de milieu EGY en erlenmeyer de 250 ml avec agitation rotative pendant 4 heures à 37°C.

b) Préculture II :

Dix millilitres de la préculture I sont inoculés dans 100 ml de milieu neuf et incubés de la même façon, 8 heures à 37°C.

c) Culture :

Nos premiers essais sont effectués dans le fermenteur précédent, c'est-à-dire une cuve de 2,5 litres contenant 1 litre de milieu EGY. L'aération est fournie par un mélange de 25 % de CO₂ dans l'air sous un débit de 8-10 litres/heure. L'agitation est réalisée comme en milieu CCY et maintenue pendant les 16 heures de culture.

Plusieurs essais de production sont effectués dans le fermenteur précédent, mais les résultats ont été négatifs.

Les essais suivants ont fait appel à un fermenteur plus grand (modèle GF 0014 CHEMAP) équipé essentiellement d'un régulateur de pH réglé entre 6,8 et 7,2, ce que n'avait pas le premier.

La deuxième préculture est alors transférée en totalité dans le fermenteur contenant 5 litres de milieu EGY à 37°C en agitation depuis une heure environ.

La régulation du pH en zone acide est effectuée par addition de NaOH, environ 1 M. Le pH ne doit pas descendre en-dessous de 6,8, il atteint en fin de culture 7,4 à 7,8.

L'aération est faite par injection du mélange : O₂ 80 % + CO₂ 20 %, sous le débit de 1 litre/minute pendant 4 heures, puis de 3 litres/minute jusqu'à la fin de la culture. L'agitation est d'abord de 100-200 t/min, puis 300-500 tours après 4 heures.

L'antimousse Rhodorsil 426 (Rhône-Poulenc) est ajoutée dans le milieu en raison de 0,5 - 1 ml par litre.

D'après notre expérience personnelle, il faut commencer à vérifier la croissance et le titre de toxine obtenue à partir de la 9^{ème} heure. La toxine atteint sa valeur maximum vers la 16^{ème} heure, puis diminue ensuite et finit par disparaître totalement.

La quantité de gamma-toxine en fin de culture est grossièrement proportionnelle à la densité de la culture. On obtient, en général, 12×10^{10} - 20×10^{12} germes par millilitre de culture avec un titre de toxine variant de 100 à 400 unités/ml. En fin de culture (16^{ème} heure), la culture refroidie

à 4°C est ensuite centrifugée pour séparer les corps microbiens.

La centrifugation se fait à 4000 t/min pendant 15 minutes dans une centrifugeuse avec circulation d'eau froide (réf. JOUAN).

1.2.1.4. Séparation de la toxine :

En fin de culture, les corps bactériens sont éliminés par centrifugation à 4000 t/min pendant 15 minutes, le surnageant est alors dilué au 1/3 dans de l'eau distillée pour abaisser sa molarité, puis porté à 20°C ou à la température du laboratoire. On ajoute 1 g d'hydroxylapatite lavé en tampon phosphate 0,001 M, pH 6,8, pour 10000 unités de toxine dosée, puis on agite sur agitateur magnétique pendant 30 minutes.

Après décantation de l'hydroxylapatite, on vérifie que toute la toxine est absorbée en contrôlant l'absence de toxine dans le surnageant.

1.2.1.5. Purification et conservation :

L'hydroxylapatite récupérée est alors placée dans un bécher et subit plusieurs lavages (3-4) en tampon phosphate 0,2 M, pH 6,8, avec agitation rotative.

A cette molarité, 90 % des protéines (staphylococciques et non staphylococciques) et tous les pigments sont éliminés au cours du lavage.

L'hydroxylapatite est ensuite transvasée dans une colonne de 30 x 7 cm, déjà remplie du tampon phosphate 0,7 M, pH 6,8, et laissée en contact une nuit

à 4°C avec le tampon. Ensuite, on commence l'élution de la toxine à la vitesse de 10-20 ml/heure ; les premières fractions ne contenant pas de toxine sont rejetées, les éluats sont récupérés suivant la concentration en toxine.

Avec le tampon de 0,7 M, on peut éluer les deux fractions en un seul pic à 0,7 M, ou séparément en deux fractions :

- Gamma I..... à 0,25 M
- Gamma II..... à 0,45 M

La toxine peut être conservée congelée à -30°C sans perte d'activité pendant plusieurs mois, ou lyophilisée pour conservation plus longue et meilleure.

- COMPOSITION DU TAMPON PHOSPHATE UTILISE :

Suivant la formule de SORENSEN, le tampon phosphate est préparé à différentes molarités.

Solutions mères :

. Solution A :

KH_2PO_4 , 1/15 Molaire P.M. = 136,086

. Solution B :

Na_2HPO_4 , 2 H_2O , 1/15 Molaire - P.M. = 177,984

- COMPOSITION DU MELANGE :

$$x \text{ ml A} + (100 - x) \text{ ml B}$$

Pour obtenir le pH adéquat, la valeur x nous est donnée par le même tableau pour chaque pH et température utilisés.

Par exemple, pour pH 6,8, température = 18°

$$\varphi = 50,8$$

c'est-à-dire, pour 100 ml de tampon, il faut prendre :

$$50,8 \text{ ml A} + 49,2 \text{ ml B.}$$

Les solutions A et B sont mélangées avant l'emploi.

1.3. METHODE DE TITRAGE DE LA GAMMA-HEMOLYSINE

1.3.1. PRINCIPE ET GENERALITES -

Le dosage de la toxine gamma est basé sur la mise en évidence de son action lytique sur les hématies humaines.

L'hémolyse étant appréciée par la densité optique de la solution au photomètre à 540 nm, la quantité de toxine présente est donc évaluée par la densité optique du mélange hématies-toxine.

Cependant, une difficulté sera rencontrée du fait des variations de sensibilité des lots d'hématies vis-à-vis de la toxine et de la nécessité de disposer d'une suspension étalonnée d'hématies assurant la reproductibilité des dosages.

En effet, le degré d'hémolyse et la densité optique varient en fonction du nombre des globules rouges présents.

On devra donc assurer des conditions opératoires, conditions de volume, temps d'incubation, dilutions, suspension d'hématies étalonnée répondant à la définition de l'unité.

1.3.2. DEFINITION DE L'UNITE DE TOXINE -

GUYONNET et PLOMMET (71) ont ainsi défini l'unité de toxine :

"La quantité de toxine provoquant la demi-hémolyse d'une suspension étalonée de globules rouges humains contient 5 unités de gamma-hémolysine".

1.3.3. DEROULEMENT DU DOSAGE -

A) PRINCIPE :

- Incubation 20 minutes à 37°C de la toxine en quantité croissante, avec une suspension de globules rouges humains sous un volume défini.
- Centrifugation à 4000 t/min pendant 2 à 5 minutes.
- Lecture de la densité optique au photomètre à 540 nm.

B) METHODE DE DOSAGE :

GUYONNET, PLOMMET et BOUILLANE (1968) - (70) - ont initialement proposé un dosage effectué avec une suspension de globules rouges humains à 1 % et des dilutions de toxine, sous un volume total de 0,7 ml. Cette technique n'était pas pratique par suite des très faibles volumes employés.

Ces mêmes auteurs ont, plus récemment, donné une autre technique dérivant de celle de JACKSON et LITTLE (84) et légèrement modifiée pour le dosage de la gamma-hémolysine.

- Une suspension de globules rouges humains (environ 11 %) lavés trois fois en solution d'Alsever est diluée en tampon Jackson Little de façon à donner, après l'hémolyse complète au 1/49 en Na_2CO_3 à 0,1 % une densité optique (D.O.) de 500 lue à 540 nm.
- Un volume de 0,5 ml de cette suspension est incubé à 37°C pendant 20 minutes en présence de quantités croissantes de toxine convenablement diluée (0,1 à 0,5 ml).
- Le volume total est ajusté à 3,5 ml avec du tampon de Jackson Little à pH 6,8.
- L'hémolyse est arrêtée après 20 minutes et centrifugée rapidement à 4000 tours pendant 2-5 minutes.
- Le surnageant est dilué à 1/7 en Na_2CO_3 à 0,1 % (1 ml de surnageant dans 6 ml de Na_2CO_3 à 0,1 %) et sa densité optique à 540 nm est notée.
- Les valeurs sont portées en fonction de la quantité de toxine sur papier logarithmique probit et donnent une droite (courbe N°3).
- La quantité de toxine correspondant à une densité optique de 250, soit 50 % d'hémolyse, contient par définition 5 unités de toxine gamma.

- COMPOSITION DU TAMPON JACKSON LITTLE :

KH_2PO_4	1,029 g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4, 12 \text{H}_2\text{O}$	4,02 g
NaCl	8 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
à pH = 6,8	

- COMPOSITION DU TAMPON ELSEVER :

Dextrose (D-glucose).....	2,05 g
Citrate de sodium.....	0,8 g
Chlorure de sodium.....	0,42 g
Eau distillée q.s.p.	100 ml

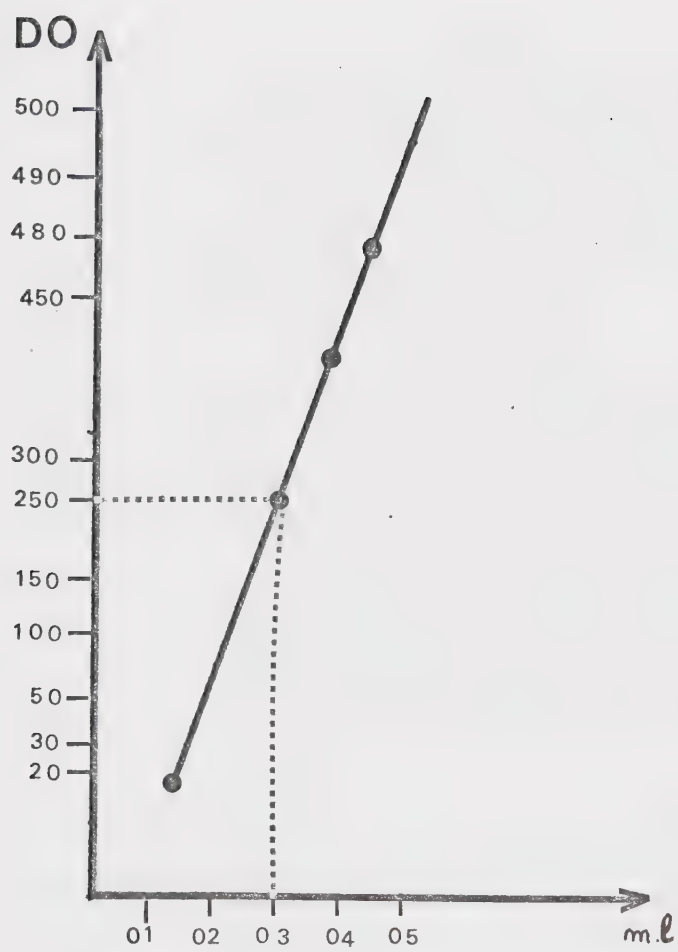
La solution est ajustée à pH = 6 par de l'acide citrique en solution à 10 %.

Stériliser 20 minutes à 110°C.

Schéma de titrage de la gamma-hémolysine

						H.O.	H.T.
Toxine en ml	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5		globules rouges humains au 1/49 dans Na ₂ CO ₃ à 0,1 %
Tampon Jackson-little	2,9	2,8	2,7	2,6	2,5	3	
Globules rouges humains étalonnés	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	
Incuber 20 minutes au bain-maire à 37°C							
Centrifugation —————→ surnageants							
Surnageants au 1/7 dans Na ₂ CO ₃ à 0,1 %							
D.O. à 540 nm	↓	↓	↓	↓	↓	0	500

H.O. = hémolyse zéro ; H.T. = hémolyse totale



- Figure 3 -

1.3.4. ETUDE DES DIFFERENTS FACTEURS INTERVENANT DANS LE TITRAGE DE LA GAMMA-HEMOLYSINE -

A) LES GLOBULES ROUGES HUMAINS :

L'unité de gamma-hémolysine se définit à partir de la lyse d'une suspension de globules rouges humains dans des conditions définies de volume, de pH et de tampon.

La valeur de l'unité dépend donc de la qualité de la suspension de globules rouges utilisée. Nous avons donc effectué différents titrages en faisant varier des paramètres pouvant intervenir sur la sensibilité des hématies vis-à-vis de la toxine, en particulier le groupe sanguin et le donneur.

Nos essais ont porté sur des hématies des groupes O^+ , O^- , A^+ , A^- , B^+ , B^- et AB, et ont montré que le groupage sanguin du donneur n'intervenait pas sur la sensibilité du dosage (tableau N° XVII) ; mais ils ont montré que les hématies provenant d'individus différents ont une sensibilité différente, comme l'avait déjà indiqué TAYLOR (159), ce qui peut être une source de variations, quoique peu importantes (tableau N° XVIII).

Pour éviter ce risque, lors des dosages d'anticorps, un témoin est systématiquement placé et doit être retrouvé au titre voulu, sinon la série est rejetée.

Dans notre technique, nous avons utilisé les globules rouges du groupe O pour la raison qu'ils sont exempts des antigènes A et B qui peuvent, par leur présence, entraîner des perturbations dans la réaction.

- TABLEAU XVII -

Résultats récapitulatifs pour un échantillon d'une toxine gamma titrant de 250 U/ml dosée vis-à-vis de globules rouges humains de différents groupes suivant la technique classique

GLOBULES ROUGES UTILISES		0,1 ml de TOXINE	0,2 ml de TOXINE	0,3 ml de TOXINE	0,4 ml de TOXINE	0,5 ml de TOXINE	TITRE en U.H./ml
AB	D.O.	250	380	420	480	480	250
A ⁺	D.O.	200	320	420	430	480	≈ 250
O ⁺	D.O.	240	340	380	420	495	≈ 250
B ⁺	D.O.	300	340	360	400	483	≈ 250
A ⁻	D.O.	260	380	410	430	510	250
O ⁻	D.O.	280	340	400	420	495	250
B ⁻	D.O.	265	320	395	410	480	250

- toxine diluée à 1/5.

- TABLEAU XVIII -

Résultats récapitulatifs pour un échantillon d'une toxine gamme titrant de 250 U/ml dosée vis-à-vis des globules rouges humains du groupe O^+ appartenant à différents individus

GLOBULES ROUGES O^+ DIFFERENTS INDIVIDUS		0,1 ml de TOXINE	0,2 ml de TOXINE	0,3 ml de TOXINE	0,4 ml de TOXINE	0,5 ml de TOXINE	TITRE en U.H./ml
O^+	D.O.	240	320	420	430	480	250
O^+	D.O.	280	380	460	460	490	250
O^+	D.O.	205	330	390	480	480	≈ 250
O^+	D.O.	245	320	420	460	490	250
O^+	D.O.	190	320	340	410	480	≈ 250

Nous avons effectué également, en parallèle du dosage classique indiqué par GUYONNET et PLOMMET, un dosage avec une suspension moins riche en hématies. Ceci confirme le fait constaté par JACKSON LITTLE (84) indiquant que l'hémolyse augmente pour une même quantité de toxine quand le nombre d'hématies est moins élevé.

TOXINE	0,1 ml de TOXINE	0,2 ml de TOXINE	0,3 ml de TOXINE	0,4 ml de TOXINE	0,5 ml de TOXINE	TITRE en U.H./ml
D.O. lue avec suspension de G.R.H. à 11,5 % D.O. au 1/49 = 500 à 540 nm	0	100	190	260	370	125
D.O. lue avec suspension de G.R.H. à 1,7 % D.O. au 1/7 = 380 à 540 nm	200	260	320	340	390	500

- toxine à 125 U diluée au 1/10.

Les titres obtenus sont différents avec les deux méthodes :

125 U.H./ml avec la suspension de globules rouges à 11,5 % (méthode classique).

500 U.H./ml avec la méthode employant les globules rouges à 1,7 %.

B) TAMPON :

Plusieurs essais ont porté sur l'étude du rôle joué par le tampon. Différents tampons ont été utilisés de manière à choisir celui qui convenait le mieux.

Les tampons essayés diffèrent par leur composition, leur force ionique, leur richesse en ions Na^+ , K^+ et Cl^- (tableau N° XIX).

Au cours de ces essais, est apparue la nécessité d'utiliser un milieu tamponné comportant des ions Na^+ , K^+ et Cl^- , dans une proportion optimum qui est retrouvée dans le tampon Jackson-Little et dans l'eau physiologique tamponnée.

Ces résultats confirment les observations de FACKRELL qui avait noté que l'activité hémolytique de la toxine gamma ne s'exerçait qu'en présence d'un taux minimum de NaCl ou ClK.

Cependant, le rôle tenu par l'ion Na^+ dans l'interaction de la gamma-hémolysine avec les érythrocytes ne peut être défini puisque le mécanisme d'action de la lysine n'est pas connu (protéase ou phospholipase) (51).

- TABLEAU XIX -

Tableau récapitulatif des tampons
utilisés vis-à-vis d'un échantillon de toxine à 250 U.H./ml

TAMPON		0,1 ml de TOXINE	0,2 ml de TOXINE	0,3 ml de TOXINE	0,4 ml de TOXINE	0,5 ml de TOXINE	TITRE en U.H./ml
Tampon phosphate 0,2 M, pH 6,8	D.O.	0	0	0	50	80	0
Tampon phosphate 0,7 M, pH 6,8	D.O.	0	0	0	0	0	0
Eau physiologique	D.O.	50	210	380	450	490	≈ 250
Tampon d'Alsever	D.O.	0	0	0	120	280	100
Tampon Jackson-Little	D.O.	100	260	350	450	495	250
Eau physiologique tamponnée	D.O.	105	265	395	460	495	250

- toxine à 250 U.H./ml diluée à 1/10.

C) TEMPERATURE ET DUREE DE LA REACTION :

Des essais ont été pratiqués pour préciser les facteurs temps et température dans le titrage de la gamma-hémolysine.

L'activité hémolytique à la température de 37°C a été lue après 5, 10, 20 et 30 minutes. La moyenne des résultats figure dans le tableau N° XX.

On note que l'hémolyse n'est pas instantanée comme elle l'est pour la toxine delta, et que le temps de 20 minutes représente le temps optimum, puis la lecture après 30 minutes de contact ne montre pas une élévation de l'hémolyse, et donc du titre.

L'activité hémolytique a été lue après 20 minutes de séjour à 4°C, 20°C, 30°C, 36°C, 37°C, 38°C.

Le tableau N° XXI montre que l'activité hémolytique n'apparaît qu'à une température supérieure à 30°C, mais qu'un écart de $\pm 1^\circ$ ne la modifie pas.

- TABLEAU XX -

*Influence de la température
sur le titrage de la gamma-hémolysine*

TEMPE- RATURE		0,1 ml de TOXINE	0,2 ml de TOXINE	0,3 ml de TOXINE	0,4 ml de TOXINE	0,5 ml de TOXINE	TITRE en U.H./ml
4°C	D.O.	0	0	0	0	0	0
20°C	D.O.	0	0	0	0	0	0
30°C	D.O.	0	0	50	160	210	≈100
36°C	D.O.	100	245	380	430	495	250
37°C	D.O.	105	249	370	430	500	250
38°C	D.O.	105	248	380	440	500	250

- toxine à 250 U.H./ml diluée à 1/10.

- D.O. = densité optique.

- TABLEAU XXI -

*Influence de la durée de réaction
sur le titrage de la gamma-hémolysine*

TEMPS		0,1 ml de TOXINE	0,2 ml de TOXINE	0,3 ml de TOXINE	0,4 ml de TOXINE	0,5 ml de TOXINE	TITRE en U.H./ml
5 minutes	D.O.	0	0	0	0	0	0
10 minutes	D.O.	9	25	142	193	210	100
20 minutes	D.O.	36	274	340	395	493	250
30 minutes	D.O.	34	214	331	368	490	250

- toxine à 250 U.H./ml diluée à 1/10.

- D.O. = densité optique.

1.4. RECHERCHE DES ACTIVITES HEMOLYTIQUES AUTRES QUE LA GAMMA (ALPHA, BETA, DELTA)

La souche Smith R5 employée ne produit ni toxine bêta, ni toxine delta, comme l'ont indiqué SMITH et PRICE (150). Nous avons cependant vérifié l'absence de bêta et delta-hémolysine dans le jus de culture et dans le produit purifié obtenu.

Nous avons également effectué une recherche rapide pour confirmer l'absence de toxine alpha.

1.4.1. RECHERCHE DE LA TOXINE ALPHA -

L'activité hémolytique de la toxine alpha n'interfère pas avec celle de la toxine gamma puisqu'elle ne lyse pas les hématies humaines ; d'autre part, elle est facile à éliminer par chromatographie sur hydroxylapatite puisqu'elle est retrouvée dans le pic de lavage à 0,2 M. Cependant, nous avons procédé systématiquement à sa recherche dans les productions.

Des quantités fixes de l'échantillon à tester (1 ml) sont mises à incuber 20 minutes à la température du laboratoire, en présence de quantités croissantes (0,4 à 4 unités) de sérum antistaphylolysine alpha (sérum Wellcome). Ensuite, on révèle l'hémolyse en ajoutant une suspension de globules rouges de lapin à 2,25 %.

Une absence d'hémolyse dans ce système indique l'absence de la toxine alpha en une dose inférieure ou égale à 0,4 U/ml (tableau N° XXII).

- TABLEAU XXII -

Tableau de titrage d'hémolysine alpha

SERUM ANTI-ALPHA en unités		0,4	1	2	4	TITRE OBTENU
PRODUCTION A	jus de culture	0	0	0	0	< 0,4 U
	produit purifié	0	0	0	0	< 0,4 U
PRODUCTION B	jus de culture	+	0	0	0	> 0,4 U
	produit purifié	0	0	0	0	0,4 U

0 = pas d'hémolyse ; + = hémolyse

1.4.2. RECHERCHE DE LA TOXINE BETA -

Etant donné qu'on ne possède pas le sérum anti-bêta-hémolysine, cela nous a conduit à étudier le phénomène "Hot-Cold" sur hématies de mouton, caractéristique de la toxine bêta.

Le dosage est effectué selon le même protocole que celui de la gamma-hémolysine : une suspension de globules rouges de mouton étalonnée donnant une densité optique de 500 à 540 nm est incubée avec la toxine 20 minutes à 37°C et la densité optique notée.

Les tubes sont laissés à 4°C pendant une nuit. Après ce délai, on procède à une deuxième lecture. Si

l'augmentation de l'hémolyse met en évidence le phénomène "Hot-Cold", il y a donc présence de bêta-toxine. Pour éviter l'interférence de la toxine gamma qui agit sur les hématies de mouton, on l'élimine par un chauffage préalable pendant 10 minutes à 60°C (tableau N° XXIII).

- TABLEAU XXIII -

Tableau de titrage d'hémolysine bêta

TOXINE en ml chauffée à 60° 10 minutes		0,1		0,2		0,3		0,4		0,5	
TEMPERATURE UTILISEE		37°	4°	37°	4°	37°	4°	37°	4°	37°	4°
PRODUCTION A	jus de culture	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+
	produit purifié	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
PRODUCTION B	jus de culture	0	0	0	0	0	0	0	+	0	+
	produit purifié	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

0 = pas d'hémolyse ; + = très faible hémolyse ;
+ = hémolyse.

1.4.3. RECHERCHE DE LA TOXINE DELTA -

Nous devons employer un moyen détourné pour mettre en évidence l'absence de la toxine delta, celle-ci est active sur les globules rouges humains comme la gamma-hémolysine.

Ces deux toxines se distinguent par leur sensibilité à la chaleur. La gamma-hémolysine est détruite par un chauffage à 60°C pendant 10 minutes, tandis que la delta-hémolysine conserve son activité dans ces conditions.

Nous procédons donc un premier titrage des surnageants de culture, puis nous inhibons la toxine gamma par chauffage à 60° pendant 10 minutes ; le deuxième dosage sera effectué dans les mêmes conditions que le premier et mettra en évidence la présence de delta-hémolysine.

Nous avons constaté une perte totale du pouvoir hémolytique sur les hématies humaines après chauffage des jus de culture et les produits purifiés, ceci confirme l'absence de delta-hémolysine.

Tenant compte que seule la delta-hémolysine a une activité lytique sur les globules rouges de cheval, nous avons recherché celle-ci dans nos jus de culture et produits purifiés, et nous ne l'avons jamais mise en évidence.

1.5. ESSAIS ET RESULTATS DES PRODUCTIONS

Plusieurs essais de production ont été effectués. Ces essais ont permis de préciser toutes les conditions demandées pour la conduite de la culture, en particulier : le volume incubé, le pH, l'aération, les différents composants du milieu et le temps de culture.

Au départ, nous avons procédé selon la méthode de production décrite par PLOMMET et BOUILLANE en 1966 (131) ; nous avons donc utilisé le milieu CCY selon le protocole précisé et n'avons obtenu que des résultats insignifiants. Mais avec quelques modifications, portant en particulier sur le temps de culture, nous avons amélioré légèrement les résultats, sans les rendre acceptables.

Les essais ont ensuite fait appel à une méthode présentée par BEZARD et PLOMMET (18). Celle-ci comporte l'utilisation du milieu EGY, permet un volume de culture plus important, donnant ainsi la possibilité de cultiver en fermenteur. Malgré des résultats satisfaisants, nous avons été amené à apporter quelques modifications dans le but de simplifier le protocole de production.

Tous ces essais ont utilisé la souche R5 de SMITH. Celle-ci nous a été fournie par PLOMMET.

1.5.1. RESULTATS OBTENUS EN MILIEU CCY -

- Essai N° 1 :

Nous avons respecté dans cette production les conditions indiquées.

- PRECULTURE I :

3 heures en 10 ml de CCY avec agitation magnétique à 37°C.

- PRECULTURE II :

4 heures en 50 ml de CCY avec agitation magnétique à 37°C.

- CULTURE :

16 heures en fermenteur de 2 litres avec aération par un mélange de 25 % de CO₂ dans l'air en débit de 6 litres/heure.

- Essai N° 2 :

Nous avons gardé les mêmes conditions de culture dans les 16 premières heures, puis nous avons prolongé la culture au-delà de 16 heures, sans aération ni agitation, afin de déceler une éventuelle apparition de toxine gamma.

Après 21 heures, une très faible quantité de toxine est produite, mais n'est pas retrouvée 5 heures plus tard (26 heures de culture).

- Essai N° 3 :

L'essai N° 2 ayant montré l'intérêt d'une prolongation du temps de culture, nous avons voulu déterminer si le temps total d'incubation préculture et culture était en jeu, ou si seul le temps de culture intervenait.

Nous avons donc fait varier le temps de préculture en conservant un temps de culture classique de 16 heures.

- PRECULTURE I :

3 heures en 10 ml CCY avec agitation magnétique à 37°C.

- PRECULTURE II :

19 heures en 50 ml CCY avec agitation magnétique à 37°C.

- CULTURE :

16 heures en fermenteur de 2 litres. Les titres en toxine obtenue étaient supérieurs à ceux des deux méthodes précédentes.

Ces essais en milieu CCY confirment :

- d'une part, la nécessité de prolonger le temps total d'incubation,
- et d'autre part, l'intérêt d'inoculer un nombre important de germes.

Tableau récapitulatif des essais effectués en milieu CCY

N° ESSAI	pH	PRECULTURE I	PRECULTURE II	CULTURE	AERATION	FERMENTEUR	RESULTAT
Essai N° 1	N.D.	3 h/10 ml	4 h/50 ml	16 h	CO ₂ + air 6 litres/h.	2 litres BIO-LAFFITE	7 U.H./ml
Essai N° 2	N.D.	3 h/10 ml	4 h/50 ml	26 h	CO ₂ + air) 6 l./h. } ^{16h}	2 litres BIO-LAFFITE	0
Essai N° 3	N.D.	3 h/10 ml	19 h/50 ml	16 h	CO ₂ + air 6 litres/h.	2 litres BIO-LAFFITE	14 U.H./ml

N.D. = non déterminé

1.5.2. RESULTATS OBTENUS EN MILIEU EGY -

- Essai N° 1 :

Nous avons réalisé un essai avec le milieu EGY selon le protocole opératoire indiqué par GUYONNET, PLOMMET et BOUILLANNE (70, 71, 131).

- PRECULTURE I :

3 heures en 10 ml de milieu EGY avec agitation magnétique à 37°C.

- PRECULTURE II :

4 heures en 50 ml de milieu EGY avec les mêmes conditions que précédemment.

- CULTURE :

16 heures en fermenteur de 2 litres avec aération par un mélange 25 % CO₂, 75 % O₂, sous débit de 6 litres/heure.

Le titre de toxine obtenue était nul.

- Essai N° 2 :

Dans cet essai, la préculture II est incubée pendant 26 heures, en gardant le reste des conditions de culture indiquées précédemment.

- PRECULTURE I :

3 heures en 10 ml de milieu EGY avec agitation magnétique à 37°C.

- PRECULTURE II :

26 heures en 50 ml de milieu EGY avec agitation magnétique à 37°C.

- CULTURE :

16 heures en fermenteur de 2 litres avec aération par un mélange 25 % CO₂, 75 % O₂, sous débit de 6 litres/heure.

Le titre de toxine gamma obtenue est très faible (≥ 10 U.H./ml).

Dans cet essai, une vérification du pH a été faite et un pH 4,5 noté en fin de culture ; la surveillance et le maintien d'un pH voisin de la neutralité n'étaient pas mentionnés dans la technique initiale.

Le milieu EGY se révèle donc insuffisamment tamponné pour une pousse abondante.

Cela nous a conduit à faire appel à un fermenteur avec régulateur de pH. Les essais suivants ont fonctionné avec un fermenteur 14 litres de type GF 0014 (CHEMAP).

Le pH est mesuré grâce à une électrode combinée en verre, stérilisable à la vapeur directe et pressurisable. L'amplificateur délivre un signal de sortie de 0 à 20 mA à 300 Ohms.

Le signal de sortie de l'amplificateur est comparé par le régulateur avec le point de consigne. A la moindre différence entre les deux signaux, le régulateur délivre

un signal de sortie proportionnel à l'importance de la déviation, qui déclenche deux pompes à tubes pour l'addition de base ou d'acide. Deux générateurs d'impulsions permettent d'ajuster les temps morts et actifs, suivant les conditions de culture.

- Essai N° 3 :

Nous avons respecté, dans cet essai, toutes les conditions de culture et les modes opératoires indiqués par BEZARD et PLOMMET (1973).

- PRECULTURE I :

4 heures en 50 ml EGY avec agitation magnétique à 37°C.

- PRECULTURE II :

4 heures en 100 ml EGY avec les mêmes conditions.

- CULTURE :

Avec 2 litres de milieu EGY dans un fermenteur de 14 litres, régulation de pH fixé à 6,9, agitation en vitesse de 600 t/min, aération avec mélange de CO_2 20 % - O_2 80 %, sous débit de 60 litres/heure.

Un prélèvement après 13 heures de culture donne un titre de 25 U.H./ml. La culture est arrêtée après 16 heures et le titre de toxine obtenue est de 50 U.H./ml.

- Essai N° 4 :

La modification a essentiellement porté sur la composition du milieu EGY. Dans cet essai, nous avons ajouté l'extrait de levure en poudre (Oxoïd) au milieu EGY, à raison de 15 g par litre, pour éviter les difficultés posées par la préparation de dialysat de l'extrait de levure.

- PRECULTURE I :

4 heures en 50 ml de milieu EGY incubé à 37°C avec agitation magnétique.

- PRECULTURE II :

8 heures en 100 ml de milieu EGY avec les mêmes conditions.

- CULTURE :

Avec 5 litres de milieu EGY modifié (4 litres préparés avec extrait de levure en poudre et 1 litre avec le dialysat), pH fixé à 7,2, aération avec mélange CO₂ 20 % - O₂ 80 %, sous débit de 60 litres/heure, agitation à 500 t/min.

Trois prélèvements sont effectués :

- après 14 heures de culture :

le titre de toxine est de 100 U.H./ml ;

- après 15 heures de culture :

le titre de toxine est de 100 U.H./ml ;

- après 17 heures de culture :

une diminution importante du titre de toxine (50 U.H./ml) confirme le fait indiqué par GUYONNET et BOUILLANE.

- Essai N° 5 :

Nous avons remplacé totalement, dans cet essai, le dialysat d'extrait de levure par l'extrait de levure en poudre, en conservant toutes les conditions présentées dans l'essai N° 4.

Un pH élevé (pH 9) est apparu par défaut au système régulateur, ce qui indique la nécessité de conserver un pH défini voisin de la neutralité pour la production de toxine, puisqu'une aucune toxine n'a été obtenue.

- Essai N° 6 :

Nous avons gardé, dans cet essai, le protocole opératoire indiqué dans l'essai précédent.

- CULTURE :

Avec 5 litres de milieu EGY (extrait de levure en poudre), pH à 7,1.

Des prélèvements successifs sont effectués à partir de la 11^{ème} heure de culture et jusqu'à la 20^{ème} heure, et sont soumis au titrage de la toxine.

<u>temps de prélèvement</u>					<u>titre de toxine</u> en U.H./ml
Après 11 heures de culture.....					0
"	12	"	"	"	25
"	13	"	"	"	25
"	14	"	"	"	50
"	15	"	"	"	100
"	16	"	"	"	100
"	17	"	"	"	50
"	18	"	"	"	50
"	19	"	"	"	10
"	20	"	"	"	0

Nous remarquons une disparition totale de la toxine après 20 heures de culture et un maximum de production après 16 heures de culture. Ce phénomène était déjà indiqué par BEZARD et PLOMMET (1973).

- Essai N° 7 :

Tenant compte des résultats obtenus dans les essais précédents, nous avons pu mettre en oeuvre toutes les conditions de culture assurant une production valable et satisfaisante.

- PRECULTURE I :

4 heures en 50 ml de milieu EGY (modifié) agité et incubé à 37°C.

- PRECULTURE II :

8 heures en 100 ml de même milieu et dans les mêmes conditions.

- CULTURE :

Avec 5 litres de milieu EGY modifié, réglage du pH à 7,1, agitation à 500 t/min.

Le pH est ajusté avec une solution NaOH (N). La culture est arrêtée après 10 heures et le titre de toxine est de 225 U.H./ml pour un volume de 4.700 ml.

- Essai N° 8 :

Dans cet essai, nous avons respecté les conditions de précultures et de culture de l'essai N° 7, mais nous avons effectué une étude de dénombrement de germes.

A chaque heure de culture, un prélèvement stérile est fait. Un ensemencement en surface a été appliqué à partir de dilutions de surnageant de culture en sérum physiologique sur une série de boîtes de Pétri d'un diamètre de 90 à 100 mm (deux boîtes par dilution). La couche de milieu gélosé doit avoir une épaisseur d'au moins 5 mm. Elle est solidifiée en position horizontale et sa surface mise à sécher complètement.

Au moyen d'une pipette stérile de 1 ml graduée à 0,1 ml, on place au centre de chaque boîte 0,1 ml de chacune des dilutions. En se servant d'un étaleur stérile en verre ou d'une öse bouclée, on répartit soigneusement et régulièrement l'inoculum sur toute la surface du milieu. On laisse sécher durant une heure à la température du laboratoire, puis on retourne les boîtes et on les porte à l'étuve à 37°C.

Pour compter les colonies après 24 heures, on les marque sur la face extérieure du fond de la boîte d'un point de crayon.

Finalement, on traduit le résultat du dénombrement par ml en tenant compte de la dilution de la solution ensemencée dans la boîte.

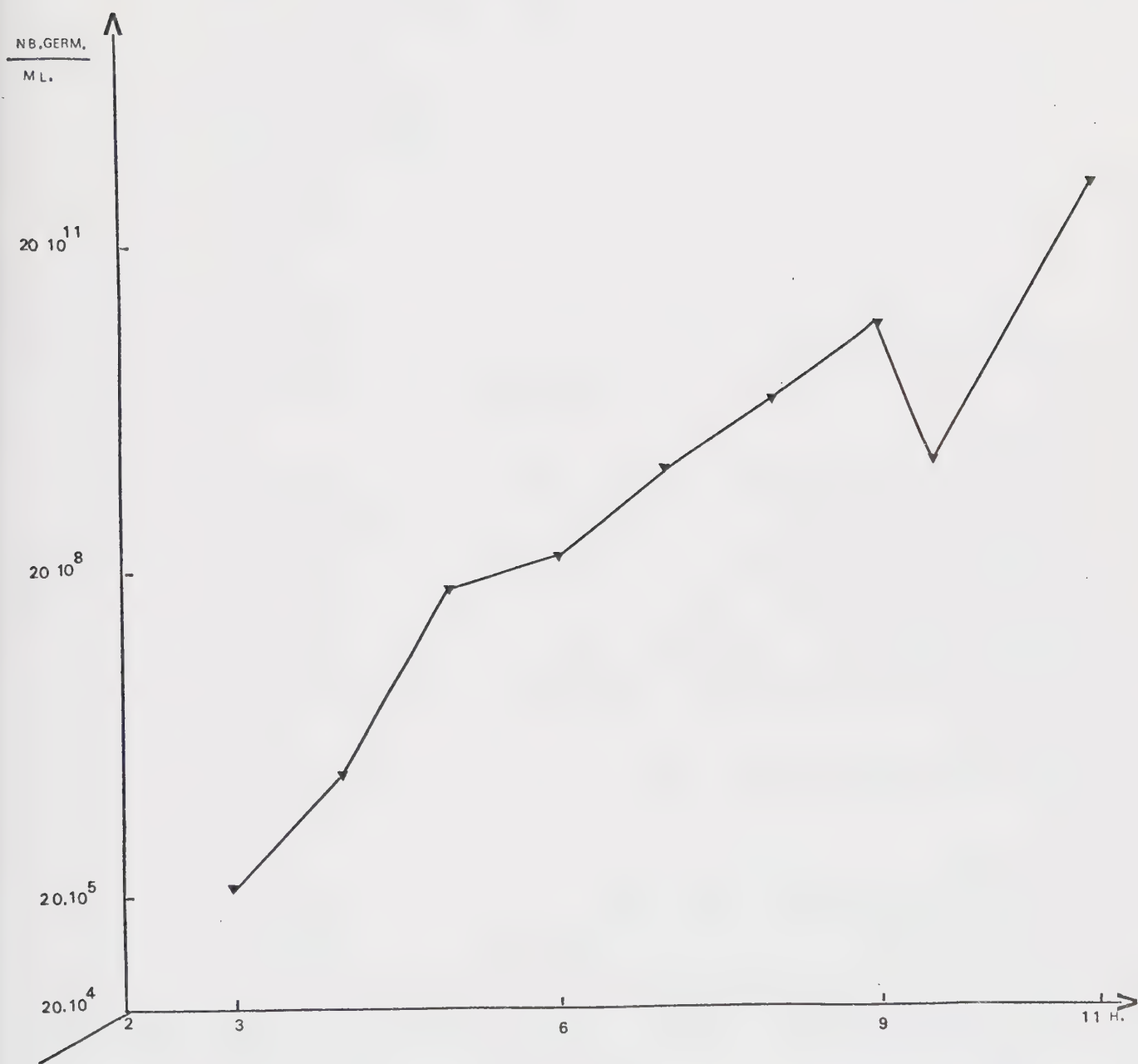
Une courbe de croissance a été effectuée à la suite des résultats obtenus. Des titrages de la toxine gamma ont été faits parallèlement au dénombrement de germes.

Les résultats confirment, comme cela a été indiqué par BOUILLANE et PLOMMET, que la production est proportionnelle au nombre de germes poussés, ce que montre le tableau N° XXIV.

- TABLEAU XXIV -

Dénombrement de germes et production de toxine gamma
au cours de 11 heures de culture

TEMPS DE PRELEVEMENT	NOMBRE DE GERMES par ml	TITRE DE TOXINE en U.H./ml
Préculture II.....	63×10^{11}	0
Après 3 heures.....	2×10^6	0
Après 4 heures.....	3×10^7	0
Après 5 heures.....	17×10^8	0
Après 6 heures.....	23×10^8	0
Après 7 heures.....	20×10^9	10
Après 8 heures.....	10×10^{10}	15
Après 9 heures.....	6×10^{11}	25
Après 10 heures.....	20×10^9	50
Après 11 heures.....	12×10^{12}	125



- Figure 4 -

Courbe de croissance de l'essai N° 8

- Essai N° 9 :

Dans cet essai, avec des conditions de culture définies précédemment, nous avons effectué une étude quantitative de la croissance bactérienne au cours de la production de toxine, mais en utilisant une technique basée sur l'opacité de la culture. Cette méthode simplifie l'évaluation de la pousse microbienne sur les prélèvements répétés aux différents temps de culture.

L'opacité est appréciée au photomètre, la densité optique d'une suspension bactérienne est proportionnelle à la masse bactérienne.

Pour cela, on pratique au préalable une numération de germes par ensemencement de différentes dilutions d'une culture de 24 heures sur milieu EGY, avec mesure simultanée de la densité optique. Une courbe étalon est établie qui permet de rapporter la densité optique d'une culture à un nombre de germes. Nous avons obtenu la courbe étalon représentée par la figure N° 5.

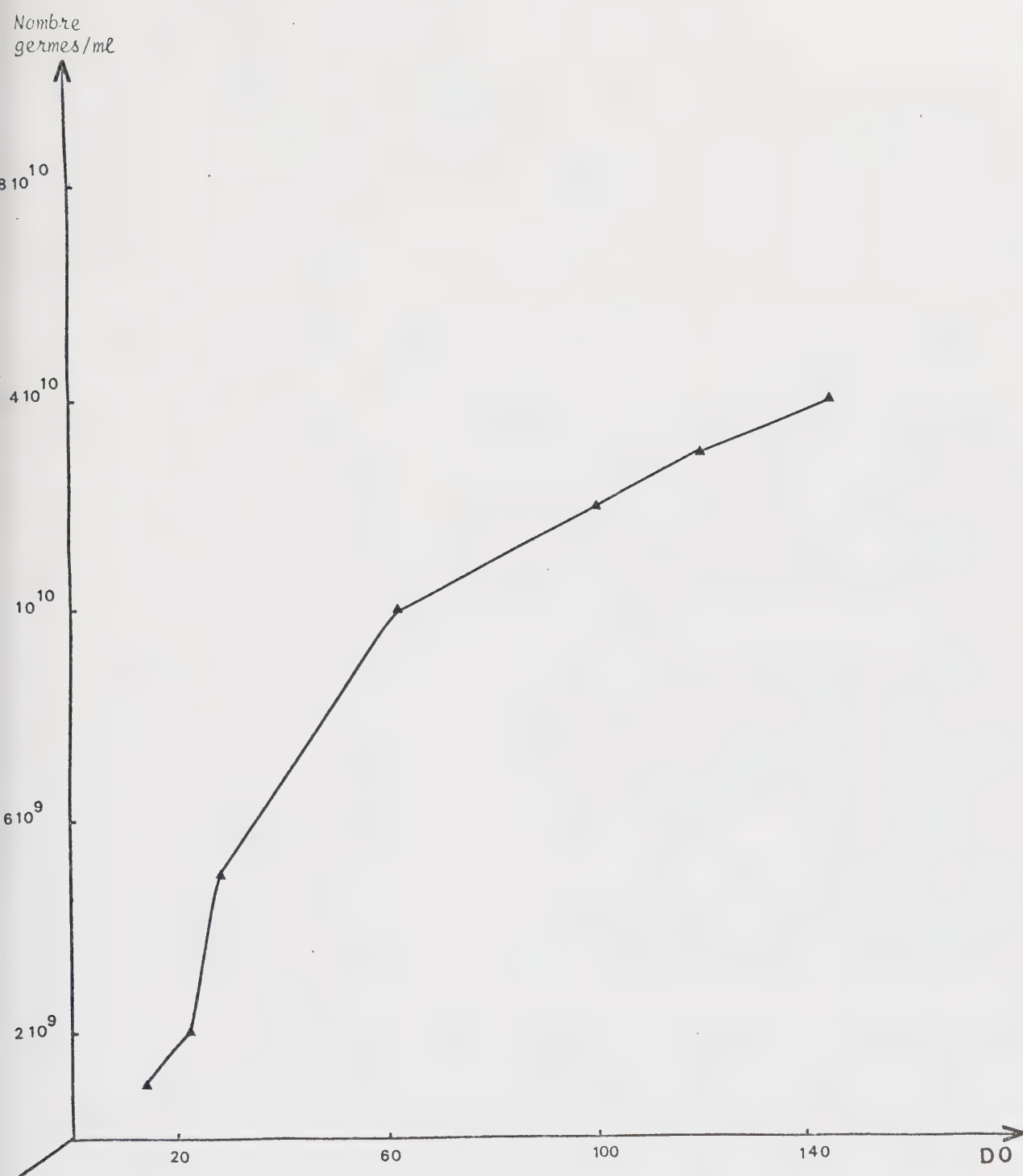
Les résultats obtenus au cours de cet essai figurent dans le tableau N° XXV.

Nous remarquons que la pousse microbienne est faible ainsi que la production de toxine. Nous attribuons ce résultat au fait que, dans cet essai, la souche de départ provenait d'une gélose coeur-cerveille ensemencée depuis 39 jours et gardée à la température du laboratoire. Ce qui confirme les indications données par PLOMMET qui conseille de ne pas utiliser une souche de départ plus ancienne que 30 jours.

- TABEAU XXV -

- Essai N° 9 -

TEMPS DE PRELEVEMENT	DENSITE OPTIQUE à 620 nm	NOMBRE DE GERMES par ml	TITRE DE TOXINE en U.H./ml
Après 6 heures.....	140	1×10^9	0
Après 7 heures.....	220	2×10^9	0
Après 8 heures.....	250	$2,5 \times 10^9$	5
Après 9 heures.....	290	3×10^9	5
Après 10 heures.....	290	3×10^9	25
Après 11 heures.....	295	$3,2 \times 10^9$	25
Après 12 heures.....	300	$3,5 \times 10^9$	25
Après 13 heures.....	300	$3,5 \times 10^9$	25
Après 14 heures.....	310	$3,6 \times 10^9$	25
Après 14 heures.....	398	$3,4 \times 10^9$	20



- Figure 5 -

Courbe de croissance de l'essai N° 8

- Essai N° 10 :

Nous avons procédé à un essai de culture avec une souche de *Staphylococcus aureus* isolée fraîchement d'une hémoculture de malade, dans le but de ne mettre en évidence qu'une souche autre que la R5 Smith peut produire in vitro et, avec les mêmes modalités de culture, la toxine gamma.

Nous avons suivi le même protocole d'entretien de souche, précultures et culture, pour cette souche.

Une pousse très importante est apparue au cours de cette culture et beaucoup plus précoce que celle de la souche R5. Le prélèvement a été fait après 9 heures et titré suivant la technique habituelle. Il a montré une hémolyse importante vis-à-vis des globules rouges humains et extrêmement rapide.

Cette activité hémolytique nous a conduit à rechercher l'activité delta-hémolysine dans le prélèvement. En le chauffant à 60°C pendant 10 minutes et en le retirant, on révèle une perte importante de l'activité hémolytique vis-à-vis des globules rouges humains.

Nous avons conclu qu'il y avait production de toxine delta (300 U.H./ml) en même temps que production de toxine gamma et que le titre de celle-ci était de 15 U.H./ml.

La cinétique particulière de l'hémolyse était due à la présence de delta-toxine. Cette production de delta-toxine est un fait normal puisque l'on sait que 97 % des souches isolées chez l'homme donnent de la delta-hémolysine. La souche R5 Smith a d'ailleurs été choisie pour étudier la gamma-hémolysine en fonction de son inaptitude à la production de delta-hémolysine.

Tableau récapitulatif des essais effectués en milieu EGY

N° D'ESSAI	MILIEU	pH	PRECULTURE I	PRECULTURE II	SOUCHE	TEMPS ET VOLUME CULTURE	AERATION	AGITATION	FERMENTEUR	TITRE DE TOXINE en U.H./ml
N° 1	EGY	-	3 h/10 ml	4 h/50 ml	Smith R5	16 heures (1 litre)	6 l/h CO ₂ + O ₂	-	2 litres Biolafitte	0
N° 2	EGY	4,5	3 h/10 ml	26 h/50 ml	Smith R5	16 heures (1 litre)	6 l/h CO ₂ + O ₂	-	2 litres Biolafitte	10
N° 3	EGY	6,9	4 h/50 ml	4 h/50 ml	Smith R5	16 heures (2 litres)	60 l/h CO ₂ + O ₂	600 t/min	GF 0014	50
N° 4	EGY (M)	7,2	4 h/50 ml	8 h/100 ml	Smith R5	(5 litres) 15 heures 17 heures	60 l/h CO ₂ + O ₂	500 t/min	GF 0014	100 50
N° 5	EGY (M)	9	4 h/50 ml	8 h/100 ml	Smith R5	16 heures (5 litres)	60 l/h CO ₂ + O ₂	500 t/min	GF 0014	0
N° 6	EGY (M)	7,1	4 h/50 ml	8 h/100 ml	Smith R5	20 heures (5 litres)	60 l/h CO ₂ + O ₂	500 t/min	GF 0014	0
N° 7	EGY (M)	7,1	4 h/50 ml	8 h/100 ml	Smith R5	10 heures (5 litres)	60 l/h CO ₂ + O ₂	500 t/min	GF 0014	225
N° 8	EGY (M)	7,1	4 h/50 ml	8 h/100 ml	Smith R5	11 heures (5 litres)	60 l/h CO ₂ + O ₂	500 t/min	GF 0014	125
N° 9	EGY (M)	7,1	4 h/50 ml	8 h/100 ml	Smith R5	15 heures (5 litres)	60 l/h CO ₂ + O ₂	500 t/min	GF 0014	25
N° 10	EGY (M)	7,1	4 h/50 ml	8 H/100 ml	Touch	8 heures (5 litres)	60 l/h CO ₂ + O ₂	500 t/min	GF 0014	15

(M) = modifiée ; CO₂ : 20 % ; O₂ : 80 %.

1.5.3. PURIFICATION DE LA TOXINE -

Les deux productions d'essais N° 7 et N° 8 sont soumises à une purification sur l'hydroxylapatite suivant la méthode classique décrite par BLEZARD et PLOMMET.

- Essai N° 7 :

Le volume de 4.700 ml de toxine brute titrant 225 U.H./ml, dans cet essai, a donné la toxine purifiée baptisée lot A.

Le lot A comporte :

300 ml d'une toxine titrant 450 U.H./ml.

130 ml d'une toxine titrant 250 U.H./ml.

- Essai N° 8 :

Sur un volume de 4.200 ml de toxine brute titrant 125 U.H./ml, nous avons effectué la purification suivant les mêmes conditions que précédemment.

Cet essai a donné la toxine purifiée baptisée lot B.

Le lot B comporte :

150 ml d'une toxine titrant 250 U.H./ml.

300 ml d'une toxine titrant 125 U.H./ml.

150 ml d'une toxine titrant 50 U.H./ml.

Nous avons donc obtenu deux lots de toxine purifiée avec un rendement de 15-20 %, ce qui paraît correct pour la méthode utilisée.

1.6. EXPOSE DES DIFFERENTS FACTEURS ET DISCUSSION DE LEUR RÔLE DANS LA PRODUCTION DE GAMMA-HEMOLYSINE

Les essais que nous avons pratiqués nous ont permis de dégager quelques notions importantes concernant la production de la gamma-hémolysine :

- L'utilisation d'une souche fraîchement répartie est toujours préférable, bien qu'il soit possible de travailler avec une souche conservée à 4°C sur gélose coeur-cervelle, mais n'ayant pas plus de quelques semaines.

La préparation et la sélection des colonies sur gélose sang humain à base d'agar purifié Oxoïd restent essentielles, comme l'ont bien indiqué BEZARD et PLOMMET (18).

L'ensemencement se fera donc à partir des seules colonies présentant l'aspect rugueux et donnant une hémolyse claire à bord flou, de 1 mm de largeur, après 24 heures, tout à fait caractéristique.

- Cet ensemencement doit être riche et subir obligatoirement deux précultures de durée totale de 12 heures, qui permettent de disposer d'un inoculum important.
- Des quelques essais pratiqués sur milieu CCY au cours desquels ni l'aération, ni le pH, n'ont été contrôlés, on ne peut tirer de conclusion, mais la complexité du

milieu fait qu'il ne puisse être préférable au milieu EGY.

Dans le milieu EGY, la présence de l'extrait de levure, plus que la nature de la peptone, est déterminante.

Si un essai (non cité) utilisant le milieu de MOLLBY avec hydrolysate de caséine et extrait de levure ne donne lieu à aucune production, la protéase-peptone a été utilisée à la place de la peptone EVANS qui n'est plus fabriquée.

Le dialysat d'extrait de levure a pu être remplacé par l'extrait de levure en poudre en raison de 15 g par litre, dose maximum utilisée pour la préparation de milieu bactériologique. Cette substitution facilite considérablement la préparation du milieu.

Le titre de la toxine brute obtenue, 125 à 225 U.H./ml pour 3,5 milliards de germes par millilitre, est essentiellement plus faible que celui obtenu par BEZARD et PLOMMET : 600 à 1.300 U.H./ml pour une pousse de 24 à 42 milliards de germes par millilitre, mais, semble-t-il, avec un rendement meilleur du nombre de germes par unité de toxine. Il n'est pas possible de préjuger de l'inter réaction de ces deux modifications sur la production puisque le rapport volume de culture/débit gazeux a été également modifié (5 litres de bouillon au lieu de 10 litres).

L'aération de la culture ($\text{CO}_2 + \text{O}_2$) s'est confirmée indispensable à la production. Il semble donc que ce soit un caractère général de la production des toxines puisque la production de gamma et de bêta-hémolysine et, à moindre échelle, celle de l'alpha-hémolysine, ont été également reconnues sous la dépendance de l'aération (37).

L'agitation complète l'aération, elle doit être modérée, créant un barbotage gazeux mais nécessitant l'emploi d'anti-mousse.

L'échec de nos essais en fermenteur Biolafitte indique que la réussite d'une production de gamma-hémolysine exige le maintien du pH de la culture au voisinage de la neutralité. Ceci nous a d'ailleurs été confirmé dans l'essai N° 5 où un dérèglement du régulateur de pH a conduit la culture à pH 9 et à l'absence d'hémolysine soit par défaut de production, soit par destruction de la toxine.

Notre expérience confirme les conclusions des nombreuses études, en particulier celles de TIRUNARAYANAN et collaborateurs (161, 165, 166, 167) et celles de ARVIDSON et collaborateurs (7, 8, 9), qui ont montré que la production de protéines extra-cellulaires par *Staphylococcus aureus* exige des conditions de culture précises concernant l'aération, l'agitation, le pH et l'utilisation d'un milieu à base d'extrait de levure.

- BEZARD et PLOMMET arrêtent à 16 heures la culture. Nous avons préféré pratiquer des prélèvements d'heure en heure, de manière à contrôler la production de toxine et, dans certains essais, d'établir la courbe de croissance du germe. L'essai N° 6 a montré que la prolongation de la culture n'améliorait pas la production qui, bien au contraire, baisse après 16 heures.

La production correspond donc à la dernière période de la phase exponentielle de pousse et à la phase de multiplication ralentie (tableau N° XXV de l'essai N° 9), et résulte d'une libération extra-cellulaire de la toxine.

EN CONCLUSION, la méthode de BEZARD et PLOMMET nous a permis de fabriquer de la gamma-hémolysine en quantité relativement faible, mais largement suffisante pour réaliser l'étude projetée.

Dans une poursuite de ce travail, il faudrait viser à augmenter la production de toxine, par amélioration des conditions de culture. La composition du milieu, le volume de la culture, devraient être modifiées de manière à obtenir une pousse microbienne plus abondante tout en conservant, si possible, le rendement nombre de germes - production de toxine brute qui a été excellent.

Notre étude confirme que la production régulière de gamma-hémolysine à titre élevé se heurte à une série de difficultés techniques et reste une opération difficile dépendant de facteurs peu codifiables.

1.7. CARACTERES ET ETUDE DE LA GAMMA-HEMOLYSINE OBTENUE

Nous avons fait la recherche de quelques caractères physico-chimiques des deux lots de gamma-hémolysine purifiée.

1.7.1. DOSAGE DE PROTEINES -

Une évaluation du taux de protéines par milligramme d'échantillon a été faite par micro-méthode de KJEDAHN et a donné les taux suivants :

- LOT A :

Azote total.....	0,378 g %
Protéines.....	2,36 g %

- LOT B :

Azote total.....	0,420 g %
Protéines.....	2,32 g %

Ce qui donne une activité spécifique de 175 U.H./mg de protéines pour le lot A et le lot B.

1.7.2. ANALYSE DES ACIDES AMINES -

Nous avons effectué une étude d'analyse sur les deux productions (A et B) suivant une méthode d'hydrolyse sous azote.

A) HYDROLYSE :

Les échantillons sont placés dans une colonne à hydrolyse avec HCl 5,6 N (MERCK, supra pure) à raison de 1 ml/mg de protéines sous azote à 110°C.

Trois déterminations sont faites par échantillon, correspondant à des temps d'hydrolyse de 24, 48, 72 heures, afin de déterminer les valeurs les plus exactes possibles des taux des acides aminés.

B) CHROMATOGRAPHIE :

L'élution des acides aminés se fait d'une façon automatique sur une colonne de 0,9 cm de diamètre intérieur remplie sur une hauteur de 45 cm par de la résine TECHNICON "CHROMOBEAB C3".

Nos résultats concordent avec ceux obtenus par FACKRELL et WISEMAN qui avaient également trouvé un taux élevé d'acide aspartique, d'acide glutamique et de glycine, et un taux bas de méthionine et de cystine (51) - (tableau N° XXVI).

- TABLEAU XXVI -

*Analyse des acides aminés
de la gamma-hémolysine A et B*

ACIDES AMINES	COMPOSITION RESIDUS pour 100 RESIDUS ACIDES AMINES	
	PRODUCTION A	PRODUCTION B
Acide aspartique.....	13,42	13,70
Thréonine.....	6,34	6,41
Sérine.....	6,68	6,68
Acide glutamique.....	10,19	9,30
Proline.....	3,68	3,47
Glycine.....	11,00	10,06
Alanine.....	8,34	8,29
Cystine.....	-	-
Valine.....	6,07	6,11
Méthionine.....	1,25	1,52
Isoleucine.....	5,32	5,71
Leucine.....	6,43	6,30
Tyrosine.....	2,81	3,51
Phénylalanine.....	2,75	2,92
Lysine.....	10,71	11,14
Histidine.....	1,77	1,80
Arginine.....	3,24	3,09

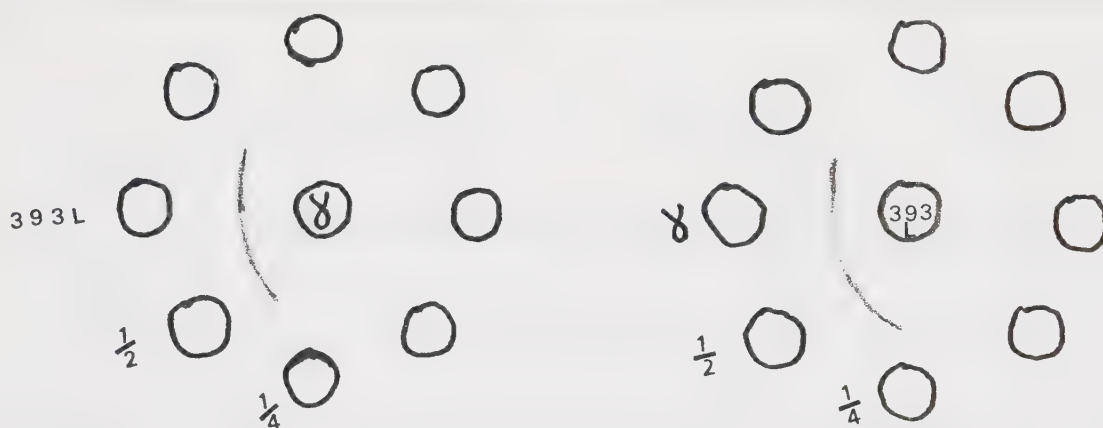
1.7.3. ETUDE IMMUNO-CHIMIQUE -

Une caractérisation de la gamma-hémolysine a été faite par électrophorèse-diffusion en gélose et immuno-électrophorèse.

- L'ELECTROPHORESE a été pratiquée sur Cellogel, dans un tampon borate de soude, pH = 10,92, sous 200 volts. La coloration a été faite à l'amido-Schwartz.

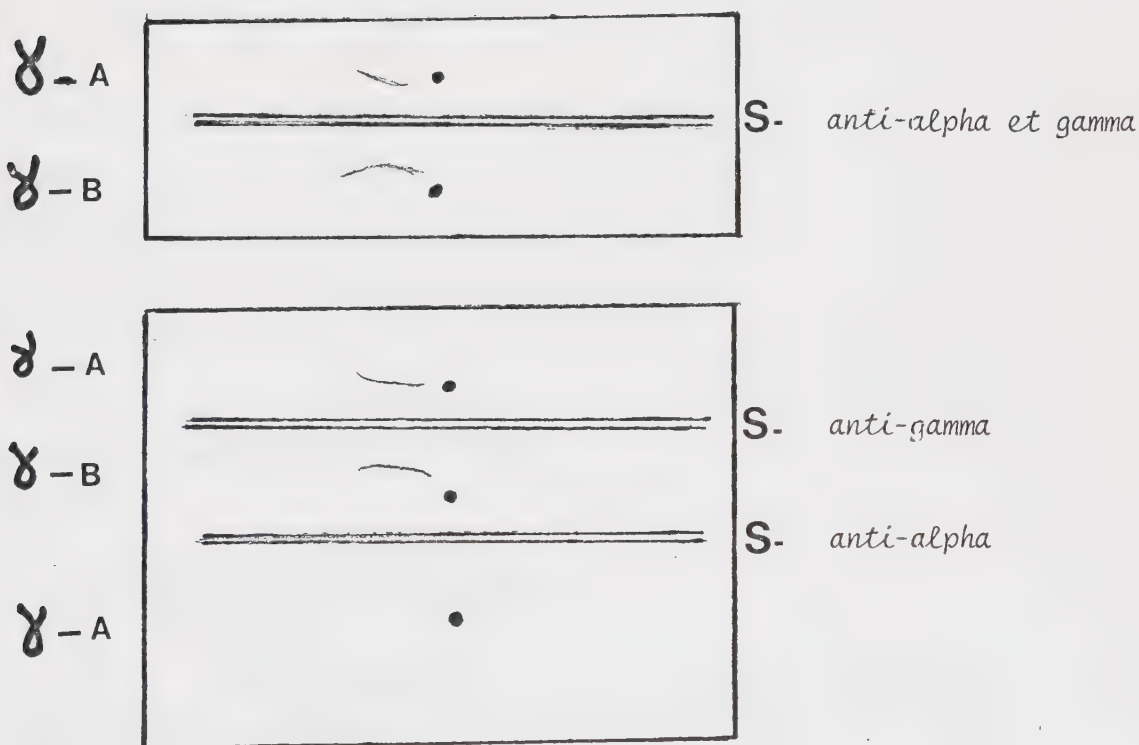
La gamma-hémolysine lot A a été séparée par 2 ml d'eau distillée (1) et par 3 ml (2). Le lot B (3) a été repris par 3 ml.

- Une DOUBLE DIFFUSION selon OUCHTERLONY a été pratiquée sur lame, en gélose à 10 p. 1000 (agar Noble Difco) dans NaCl 8,5 p. 1000. L'antisérum utilisé est un sérum de lapin (N° 393) immunisé par la gamma-hémolysine en injection sous-cutanée, en présence de M.D.P. et titrant 2.560.



- L'IMMUNO-ELECTROPHORESE a été pratiquée en gélose à 12,5 p. 1000 (agar Noble Difco) en tampon véronal-véronal sodé 0,05 M, pH 8,2, pendant 90 minutes sous une tension de 6 V/cm et colorée à l'ozo-carmin.

Les antisérums utilisés sont le sérum de référence de WELLCOME BURROUGHS, à activité anti-gamma et anti-alpha-hémolysine, et des sérums humains à activité anti-gamma-hémolysine (titre : 1.280) et à activité anti-alpha-hémolysine (15 U./ml).



1.7.4. SPECTRE D'ACTIVITE HEMOLYTIQUE -

L'activité de la toxine est testée sur des suspensions de globules rouges de différentes espèces : homme, mouton, lapin, cheval, de manière à préciser leur sensibilité vis-à-vis des deux toxines produites et, ainsi, d'établir le spectre d'activité qui est caractéristique de chaque classe d'hémolysine staphylococcique.

Les résultats obtenus sont les suivants :

GLOBULES ROUGES	LOT A	LOT B	GAMMA	ALPHA	DELTA
Lapin.....	++++	++++	++++	+++	+++
Mouton.....	+++	+++	+++	+	+
Homme.....	++	++	++	0	++
Cheval.....	0	0	0	0	+++

Ces résultats caractérisent une hémolysine de type gamma.

1.7.5. ACTION DES INHIBITEURS -

Pour confirmer l'identité de l'hémolysine obtenue vis-à-vis de la delta-hémolysine, nous avons soumis les deux échantillons à l'action inhibitrice de la chaleur et de l'agar, de l'héparine, du sulfate de Dextran et de l'EDTA, qui sont reconnus inhibiteurs pour la seule hémolysine gamma.

- METHODE :

Un chauffage à 60°C pendant 10 minutes inhibe la gamma-hémolysine et laisse intacte la delta-hémolysine.

L'agar, l'héparine et le sulfate de Dextran, dont le mécanisme d'inhibition est commun, ont été incubés pendant 10 minutes à la température du laboratoire vis-à-vis de doses de gamma-toxine s'étendant de 5 à 50 unités, en raison de 1 ml de solution d'agar à 0,2 %, 0,12 U.I./ml d'héparine et 0,2 mg/ml de sulfate de Dextran, selon la technique décrite par TAYLOR et BERNHEIMER (160).

La suspension de globules rouges humains est ensuite ajoutée et le dosage conduit selon la méthode classique. L'inhibition s'est révélée complète pour toutes les doses de gamma-hémolysine étudiées.

Le pouvoir inhibiteur de l'EDTA a été mis en évidence par la technique de FACKRELL et WISEMAN (51). 1 ml de solution d'EDTA contenant 10^{-2} M, c'est-à-dire une solution à 3,8 o/ooo a été incubée avec 50 unités de gamma-toxine à 37°C pendant une heure, la suspension de globules rouges humains étant ajoutée ensuite comme dans le dosage habituel. Les 50 unités de toxine ont été inhibés pour les deux échantillons.

Les résultats de cette investigation sont les suivants :

TOXINE	CHAUF- FAGE	AGAR	HEPARINE	SULFATE DEXTRAN	EDTA
Lot A...	+	+	+	+	+
Lot B...	+	+	+	+	+
Gamma...	+	+	+	+	+
Delta...	-	-	-	-	-

+ = inhibition ; - = absence d'inhibition.

L'ensemble de ces résultats montre que les deux lots de gamma-hémolysine préparés répondent aux critères d'activité de la gamma-hémolysine staphylococcique. Bien que l'activité spécifique rapportée au milligramme de protéine soit faible (178 U.H./mg), il n'existe pas d'activité hémolytique parasite.

Le rendement de nos essais de purification est de l'ordre de 20 %, ce qui apparaît également faible par rapport à celui obtenu par BEZARD et PLOMMET et même par TAYLOR et BERNHEIMER (30 à 40 %), qui font une double purification sur hydroxylapatite.

On peut donc conclure que, entre nos mains, la méthode décrite par BEZARD et PLOMMET nous a permis d'obtenir de la gamma-hémolysine purifiée, mais que, tant au niveau de la culture qu'au niveau de la purification, les conditions méthodologiques doivent être revues, de manière à en améliorer le rendement.

Cette gamma-hémolysine ainsi préparée, titrée et contrôlée par le Docteur TAYLOR, nous a permis la suite de notre étude.

2.

RECHERCHE DES ANTICORPS

ANTI-GAMMA HEMOLYSINE ET ANTI-ALPHA-HEMOLYSINE

STAPHYLOCOCCIQUES

I N T R O D U C T I O N :

L'élévation des anticorps anti-alpha-hémolysine n'apparaît pas être une réponse sérologique d'une fiabilité suffisante pour qu'on puisse lui attribuer une valeur sémiologique absolue.

Aussi, a-t-on suggéré que le titrage des anticorps anti-gamma-hémolysine pourrait représenter un autre moyen de détection et de surveillance de la réponse immunitaire au cours des staphylococcies, en particulier ostéo-articulaires.

Nous exposerons la méthode de titrage des anticorps anti-gamma-hémolysine en faisant l'étude critique de quelques-uns de ses paramètres, et nous rappellerons la méthode de titrage des anticorps anti-alpha-hémolysine.

2.1. METHODE DE TITRAGE DES ANTICORPS ANTI-GAMMA-HEMOLYSINE

2.1.1. PRINCIPE DE DOSAGE -

A la différence du dosage des anticorps anti-alpha-hémolysine, pour lequel on possède un sérum anti-alpha étalon permettant de doser la toxine standard, puis de titrer à l'aide de cette toxine les anticorps dans les sérums de malades, nous ne possédons pas d'anti-gamma-hémolysine standard et nous devons rechercher les anticorps anti-gamma par une réaction de neutralisation du phénomène hémolytique en utilisant la toxine que nous avons produite et titrée. En présence d'anticorps neutralisants, il y a disparition du pouvoir hémolytique de la toxine gamma vis-à-vis des globules rouges humains.

La réaction s'effectue en deux temps :

- REACTION DE NEUTRALISATION :

A une galerie de dilutions du sérum à tester, nous ajoutons une quantité constante de toxine gamma, quantité produisant la demi-hémolyse. Cette réaction s'effectue à la température du laboratoire pendant 20 minutes, suivant PLOMMET (1974).

- REVELATION DE LA NEUTRALISATION :

La neutralisation de la toxine par les anticorps est mise en évidence en ajoutant des globules rouges humains : le dernier tube où il y a inhibition de l'hémolyse ou hémolyse à moins de

50 % contient une quantité d'anticorps capables de neutraliser les 5 unités de toxine gamma présentes. Donc le titre en anticorps est lu d'après la dilution concernée.

Nous avons exprimé tous nos résultats en inverse de dilution et non pas en unités arbitraires définies par TAYLOR et PLOMMET (159).

2.1.2. MATERIEL -

- EAU PHYSIOLOGIQUE TAMPONNEE :

NaCl.....	8,5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
K ₂ H PO ₄	2 g
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

à pH = 6,8 ; 6,9.

- GLOBULES ROUGES HUMAINS :

Nous avons utilisé les globules rouges du groupe O⁺, lavés trois fois en tampon d'Alsever.

Après le troisième lavage, le culot est prélevé et dilué en Alsever à 11-12 %.

- TOXINE GAMMA :

La toxine lyophilisée est reprise avec de l'eau distillée et titrée de façon à avoir 25 U.H./ml.

- SERUM :

Décomplémenté à 56° pendant 30 minutes.

2.1.3. METHODE DE TITRAGE -

On pratique au préalable un titrage de la toxine gamma suivant la méthode classique, et on la dilue pour avoir une toxine à 25 U.H./ml.

Les sérums à tester sont dilués en eau physiologique de 1/2 en 1/2 sous un volume de 1 ml à partir d'une dilution 1/5 jusqu'à 2.560 suivant le schéma page 143.

Un volume de 0,2 ml de toxine est ajouté au rhéomètre dans chaque tube de sérum dilué. On laisse alors en contact 20 minutes à la température ambiante afin de permettre la réaction antigène-anticorps.

Après ce temps de contact, on ajoute dans chaque tube 0,2 ml de suspension de globules rouges étalonnée (mêmes globules rouges utilisés pour le titrage de la toxine) et on laisse en contact au bain-maire à 37°C pendant 30 minutes.

Les tubes sont centrifugés, puis on recherche dans chaque galerie le premier tube de la série, non hémolysé ou hémolysé à moins de 50 %, qui permettra de déterminer le titre en anticorps contenus dans le sérum considéré, titre exprimé en inverse de dilution.

- N.B. : Un titrage préalable d'un sérum étalon est obligatoire avant d'effectuer le titrage des sérums à tester, de manière à vérifier la sensibilité du lot de globules rouges. Nous avons utilisé, comme sérum étalon positif, le sérum anti-alpha-hémolysine WELLCOME BURROUGHS (K 1103) qui s'est révélé avoir une activité anti-gamma-hémolysine (TAYLOR - 159). Son titre doit être retrouvé à la dilution 1/1600.

2.1.4. REPRODUCTIBILITE ET CONCORDANCES -

Avant d'effectuer les titrages d'anticorps anti-gamma-hémolysine prévus dans notre expérimentation, nous avons procédé à quelques contrôles portant sur la neutralisation de l'activité hémolytique des toxines préparées, la reproductibilité de la méthode de dosage des anticorps et l'étalonnage de nos résultats.

- NEUTRALISATION :

Nous avons vérifié que le titre en anticorps obtenu était identique, quel que soit le lot d'hémolysine gamma utilisé. Pour cela, le sérum de référence WELLCOME ainsi que les sérums de référence fournis par le Docteur PLOMMET ont été titrés comparativement avec la gamma-hémolysine A et la gamma-hémolysine B. Les résultats sont figurés dans le tableau N° XXVII.

- REPRODUCTIBILITE :

On s'assure de la reproductibilité des résultats par le titrage extemporané du sérum de référence WELLCOME. Si le titre n'est pas retrouvé, la suspension d'hématies et la toxine sont revérifiées ou rejetées, ce qui est très exceptionnel.

- ETALONNAGE DES RESULTATS :

Un premier étalonnage a été réalisé avec les sérums négatif et positif du Docteur PLOMMET : dans notre laboratoire, le sérum négatif a été retrouvé au 1/5, mais le sérum positif au 1/160 au lieu du 1/320.

- TABLEAU XXVII -

Tableau récapitulatif du titrage d'anticorps anti-gamma-hémolysine
vis-à-vis de deux lots de témoins dans différents sérums de référence

TOXINE	SÉRUM	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80	1/160	1/320	1/640	ASTL gamma
Toxine (lot A)	Sérum N° 722 (Docteur PLOMMET)							+	+	160
Toxine (lot B)	Sérum N° 722 (Docteur PLOMMET)							+	+	160
Toxine (lot A)	Sérum N° 3.076 (Docteur PLOMMET)		+	+	+	+	+	+	+	5
Toxine (lot B)	Sérum N° 3.076 (Docteur PLOMMET)		+	+	+	+	+	+	+	5
TOXINE	SÉRUM	1/25	1/50	1/100	1/200	1/400	1/800	1/1600	1/3200	ASTL gamma
Toxine (lot A)	Sérum WELLCOME (K 1103)								+	1600
Toxine (lot B)	Sérum WELLCOME (K 1103)								+	1600

+ = hémolyse.

Par contre, le sérum de référence WELLCOME est toujours retrouvé, comme l'indique TAYLOR, positif au 1/1600. Le Docteur TAYLOR a récemment titré dans son laboratoire, avec notre gamma-hémolysine B, son sérum positif de référence et a retrouvé son titre au 1/800. Des sérums de malades titrés par le Docteur TAYLOR et par nous-même ont été retrouvés au même titre.

Ces contrôles techniques ont été jugés satisfaisants.

- REPONSE IMMUNOLOGIQUE :

Nous avons enfin confirmé que, comme le laissait prévoir la positivité du sérum WELLCOME anti-alpha-hémolysine, une gamma-hémolysine produite par la souche Smith R5 pouvait révéler des anticorps anti-gamma-hémolysine produits in vivo par une autre souche.

Pour cela, 20 sérums de lapins ayant reçu en injection ostéo-articulaire une suspension du staphylocoque Toucheboeuf et ayant des titres variables d'anticorps anti-alpha-hémolysine ont été titrés, et un taux d'anti-gamma-hémolysine a été retrouvé, comme l'indique le tableau N° XXVIII.

- TABLEAU XXVIII -

Titration par la gamma-hémolysine de Staphylococcus aureus Smith R5 de sérums de lapins infectés par Staphylococcus aureus Toucheboeuf

LAPIN N°	ASTL alpha	ASTL gamma	LAPIN N°	ASTL alpha	ASTL gamma
141	10,12	320	97	4	320
141	6,4	160	101	6	160
111	4,3	320	101	8,25	160
111	11,25	160	108	2	80
111	15,2	320	110	1,2	160
99	7	160	144	3,35	10
99	7	320	140	3,35	10
106	17	320	143	7,5	20
106	17,7	160	128	1,6	320
99	5	320	110	1,5	160

2.2. METHODE DE TITRAGE DES ANTICORPS ANTI-ALPHA-HEMOLYSINE

2.2.1. PRINCIPE DE DOSAGE -

RAMON a défini la dose-test hémolytique qui est la plus petite quantité d'hémolysine capable d'entraîner l'hémolyse totale de 2 ml de globules rouges de lapin à 5 %, que neutralise une unité de sérum antitoxique. L'unité antitoxique internationale a été établie d'après les conventions du Comité d'éta-
lonnage de la Société des Nations : c'est l'activité neutralisante vis-à-vis de la toxine staphylococcique contenue dans 0,5 mg de la préparation standard.

En présence d'anticorps neutralisants, il y a disparition du pouvoir hémolytique de la toxine alpha vis-à-vis des globules rouges de lapin.

La réaction s'effectue en deux temps :

- La REACTION DE NEUTRALISATION DE TOXINE (antigène-anticorps),
- et la REVELATION DE LA NEUTRALISATION en ajoutant les hématies de lapin.

2.2.2. MATERIEL -

- EAU PHYSIOLOGIQUE.

- GLOBULES ROUGES DE LAPIN :

Nous utilisons une suspension des hématies de lapin à 2,25 % dans du tampon physiologique.

Les hématies sont lavées deux fois dans du sérum physiologique.

- SERUM ETALON :

Nous utilisons le sérum étalon WELLCOME BURROUGHS (K 1103) qui se présente en ampoules de 140 unités antitoxiques internationales par millilitre, que nous diluons de façon que :

$$0,5 \text{ ml} = 0,1 \text{ unité.}$$

- TOXINE ALPHA :

La toxine utilisée est également la toxine WELLCOME BURROUGHS qui se présente en ampoules de 400 unités internationales, que l'on dissout dans 10 ml de sérum physiologique pour obtenir la toxine mère : 1 ml de toxine mère est dilué dans 75 ml de tampon physiologique.

- Les SERUMS sont décomplémentés à 56°C pendant 30 minutes.

2.2.3. METHODE DE TITRAGE -

Un titrage de la toxine alpha (WELLCOME) est pratiqué suivant le schéma suivant :

Sérum étalon.....	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50
Lysine (so- lution mère 1/75).....	0,05	0,10	0,15	0,20	0,25	0,30	0,35	0,40	0,45	0,50	
Tampon.....	1,45	1,40	1,35	1,30	1,25	1,20	1,15	1,10	1,05	1	

On laisse 20 minutes à la température du laboratoire. On ajoute dans chaque tube 0,50 ml de la solution d'hématies de lapin. Puis on met au bain-marie à 37°C.

La dose de staphylolysine à employer est celle qui donne l'hémolyse 50 %.

Une préparation d'une gamme de sérum étalon est effectuée suivant le tableau suivant :

SÉRUM ETALON :

Sérum au 1/20....	0,25	0,35	0,40	0,45	0,50	0,55	0,60	0,65	0,75	
Tampon phy- siologique.	0,75	0,65	0,60	0,55	0,50	0,45	0,40	0,35	0,25	
Soit, en unité.....	0,05	0,07	0,08	0,09	0,10	0,11	0,12	0,13		

- SERUM A TESTER :

Nous faisons une dilution de base au 1/10 dans du sérum physiologique (0,3 ml de sérum + 2,7 ml de sérum physiologique), puis des dilutions de 2/3 en 2/3 en eau physiologique.

SERUM 1/10 3 ml

Tampon physiologique	0	1	1	1	1	1	1	1	2 ml que l'on jette	
soit, une dilution de	1/10	1/15	1/22,5	1/33,5	1/50	1/75	1/112,5	1/168,75		

A chaque tube des gammes précédentes, on ajoute la toxine alpha qui n'a pas besoin d'être réactivée, à la dose donnée pour le titrage sous le volume de 0,50 ml. On ajoute 0,50 ml de sérum physiologique.

On laisse 20 minutes à la température du laboratoire. Puis on porte au bain-marie à 37°C, on ajoute 0,50 ml de globules rouges de lapin et on laisse une heure.

On centrifuge et la lecture se fait au photomètre à 550 nm.

Le calcul du taux antistaphylolysine alpha se fait en rapportant la dilution du tube de sérum qui donne la demi-hémolyse au tube de la galerie étalon qui donne l'hémolyse à 50 %.

3.

EXPERIMENTATION ANIMALE

I N T R O D U C T I O N :

TAYLOR et PLOMET ont mis en évidence des titres élevés d'anticorps anti-gamma-hémolysine dans les ostéomyélites staphylococciques et ont tenu cette élévation comme un élément diagnostique intéressant.

Dans une étude chez le lapin, nous avons réalisé une ostéo-arthrite expérimentale par inoculation ostéo-articulaire de la souche Smith R5 et nous avons analysé la réponse immunologique vis-à-vis du germe infectant.

Pour cela, nous avons titré les anticorps anti-gamma et anti-alpha-hémolysine dans le sérum de ces lapins.

Nous avons complété l'expérimentation en vérifiant le pouvoir immunogène de la gamma-hémolysine purifiée obtenue précédemment, injectée chez le lapin par voie sous-cutanée en présence des différents adjuvants.

3.1. DETERMINATION DU TAUX NORMAL D'ANTI-GAMMA-HEMOLYSINE CHEZ LE LAPIN

La détermination du taux normal d'anti-gamma-hémolysine chez le lapin a été faite à partir de l'étude du sérum de 60 lapins reconnus sains, ultérieurement soumis à une inoculation ostéo-articulaire de staphylocoque.

Les résultats figurent dans le tableau N° XXIX.

Le taux moyen d'anti-gamma-hémolysine est de 17,3 ; 2 lapins ont un titre de 40 (3,3 %). Chez le lapin, le taux d'anti-gamma-hémolysine doit être considéré comme élevé s'il est supérieur à 40, et douteux au titre 40.

Simultanément, le taux d'anti-alpha-hémolysine a été titré, et le taux moyen trouvé a confirmé que 100 % des lapins sains ont un taux inférieur à 2 U.I. (133).

- TABLEAU XXIX -

TAUX DES ANTISTPAHYLOLYSINES ALPHA ET GAMMA
chez le lapin normal (60 lapins ♂ ou ♀)

LAPIN N°	ASTL ALPHA en U. I.	ASTL GAMMA en inverse de dilution	LAPIN N°	ASTL ALPHA en U. I.	ASTL GAMMA en inverse de dilution
264	<0,7	10	351	<0,7	20
272	<0,7	10	352	<0,7	20
273	<0,7	20	353	0,7	20
274	<0,7	10	354	0,75	10
275	<0,7	20	355	<0,7	20
341	0,7	10	356	<0,7	10
342	<0,7	40	357	<0,7	10
343	<0,7	20	358	<0,7	20
344	0,75	20	359	<0,7	20
345	0,9	20	360	<0,7	10
346	0,7	20	266	<0,7	20
347	0,7	40	267	0,9	10
348	<0,7	20	268	0,8	20
449	1,35	20	269	<0,7	10
350	<0,7	20	270	0,8	10
391	<0,7	20	320	<0,7	20
392	0,75	10	313	<0,7	20
393	<0,7	20	314	<0,7	20
394	<0,7	20	317	<0,7	20
401	<0,7	20	318	0,75	20
395	0,7	20	321	<0,7	10
396	<0,7	20	322	<0,7	10
397	0,7	20	324	0,9	10
398	<0,7	20	325	<0,7	20
399	<0,7	20	326	<0,7	20
400	0,8	20	327	<0,7	10
311	<0,7	20	328	0,7	10
312	<0,7	20	323	0,85	10
315	<0,7	10	402	<0,7	10
316	<0,7	20	319	<0,7	20

$\bar{x}$ = taux moyen d'anti-gamma-hémolysine : 17,3

3.2. ETUDE DE LA REPONSE
EN ANTICORPS ANTI-GAMMA-HEMOLYSINE STAPHYLOCOCCIQUE
AU COURS DE L'OSTEO-ARTHRITE EXPERIMENTALE DU LAPIN

3.2.1. PROTOCOLE EXPERIMENTALE -

A) CHOIX DU LAPIN COMME ANIMAL D'EXPERIMENTATION :

Nous avons choisi le lapin comme animal d'expérimentation pour les raisons principales suivantes :

- le lapin présente une bonne sensibilité à l'infection staphylococcique ;
- les grosses veines de l'oreille permettent des prélèvements de sang itératifs ;
- une production d'antistaphylolysine alpha a été observée initialement in vivo chez le lapin et, d'autre part, le pouvoir antigénique des staphylolysines a été prouvé de manière précise par le dosage des anticorps neutralisants (BARJON) - (11) ;
- l'ostéomyélite expérimentale du lapin reproduit d'assez près l'ostéomyélite humaine.

Les lapins choisis sont pour la plupart des mâles (47 lapins) de 2,5 - 3 kg, de race pure "fauve de Bourgogne". Ils sont gardés en cage individuelle, maintenus dans de bonnes conditions de nourriture, d'hygiène et de surveillance.

B) CHOIX DE LA SOUCHE :

Nous avons utilisé la souche *Staphylococcus aureus* (Smith R5). Ce choix est basé sur l'importance de production de toxine gamma in vitro par celle-ci et dans l'intention de mettre en évidence la sécrétion in vivo de toxine gamma et le pouvoir immunogène de celle-ci.

La souche Smith R5 a été fournie par le Docteur PLOMMET ; ses caractères biochimiques et lysotypiques ont été confirmés.

<u>Souche</u>	<u>Catalase</u>	<u>Coagulase</u>	<u>Mannitol</u>	<u>Groupes phagiques</u>
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	+	+	III (phages actifs)
Smith R5				6 42 E, 47-53 83 A - 84

C) PREPARATION DES SUSPENSIONS DE STAPHYLOCOQUE :

A partir d'une souche ensemencée sur gélose au sang humain, une colonie sélectionnée de type gamma est mise en culture à 37°C dans un bouillon ordinaire additionné de 2 % de glucose et de 2 % de bicarbonate de sodium pendant 24 heures, suivie d'une centrifugation de 20 minutes, de plusieurs lavages portés sur le culot de germes avec du sérum physiologique à deux reprises et, enfin, suivie d'une centrifugation de 20 minutes permettant d'obtenir la suspension destinée à l'inoculation des lapins.

D) DETERMINATION DU NOMBRE DE GERMES :

La détermination du nombre de germes a été pratiquée par mesure de la densité optique, la référence prise étant le vaccin DIVASTA Pasteur (1,5 ml = 6 milliards de staphylocoques).

La densité optique est lue à 620 nm et est notée pour la référence à 450. A la suite de l'étalonnage, 4 suspensions de germes ont été faites : 50, 100, 200, 500 millions de germes par ml d'eau physiologique.

E) MODE D'INOCULATION :

L'inoculation, à la fois intra-osseuse et intra-articulaire, a été pratiquée à l'aide d'un trocard : elle consiste à infecter l'épiphyse inférieure du fémur droit à travers l'articulation du genou. Cette technique a paru justifiée pour obtenir une ostéoarthrite sans ouverture du foyer d'infection dans les parties molles (11).

F) METHODE DE PRELEVEMENT UTILISEE :

Sur les bords interne et externe de l'oreille, existe une petite veine superficielle qui s'unit à d'autres petites veines pour former la veine faciale, puis la veine jugulaire externe. Cette veine, recouverte de peau fine, est rendue visible et facilement accessible en tenant entre deux doigts la base de l'oreille.

Pour une bonne vaso-dilatation veineuse, nous avons mouillé le bord externe de l'oreille avec un coton imbibé d'un mélange xylène-éthanol, le sang étant recueilli dans un tube sec de 5 ml.

Le prélèvement est laissé deux heures à la température de 20°C. On décolle le caillot à l'aide d'une pipette

Pasteur boutonnée, et le tube est placé à 4°C pendant 16 à 18 heures. Le sérum est alors décanté et centrifugé, puis stocké à -18°C.

Tous les prélèvements provenant d'un lapin sont situés dans la même série.

G) REPARTITION DES LAPINS :

Les 47 lapins étudiés se répartissent de la manière suivante :

5	lapins	reçoivent	50 millions de germes
5	"	"	100 " " "
10	"	"	200 " " "
10	"	"	500 " " "
6	"	"	200 millions de germes + 1 ml adjuvant complet Freund
6	"	"	200 millions de germes + 1 mg M.D.P.
5	lapins	reçoivent	200 millions de germes sans adjuvant.

3.2.2. RESULTATS -

Tableaux N° XXX à XXXIII.

- TABLEAU XXX -

TAUX D'ANTISTAPHYLOLYSINE GAMMA

chez les lapins ayant reçu 50 millions de germes en injection ostéo-articulaire
(résultats exprimés en inverse de dilution)

N° LAPIN	J 0	1 S	2 S	3 S	4 S	5 S	6 S	7 S	8 S	9 S	10 S	11 S
266	20	80	80	20	160	160	160					
267	10	10	160	80	160	320	320	320	640	320	320	
268	20	20	20	40	40	40	320	640	640	640	1280	640
269	10	20	20	40	80	80	40	160	160	320	320	320
270	10	80	160	640	640	640	320	160	80	40	40	80
Moyenne : $\bar{x}$	14	42	88	164	216	248	232	320	380	330	490	346,6
Ecart-type $\sqrt{\sigma}$	5,47	34,92	70,142	266,98	242,65	243,96	127,74	226,27	301,99	245,22	542,95	280,95

- TABLEAU XXXI -

TAUX D'ANTISTAPHYLOLYSINE GAMMA

chez les lapins ayant reçu 100 millions de germes en injection ostéo-articulaire
(résultats exprimés en inverse de dilution)

N° LAPIN	J 0	1 S	2 S	3 S	4 S	5 S	6 S	7 S	8 S	9 S	10 S	11 S
264	10	160	160	320	640	1280						
272	10	40	160	640	320	320	160	160	80	320	160	160
273	20	80	320	320	320	320	320	160	160	80	80	80
274	10	80	320	320	80	320	640	320	320	320	320	320
275	20	160	80	320	320	320						
Moyenne : $\bar{x}$	14	104	208	384	336	512	373,3	213,3	186,6	240	186,6	186,6
Ecart-type $\sqrt{\sigma}$	5,47	53,66	107,33	143,10	199,19	429,32	244,4	92,37	122,20	138,55	122,20	122,20

TAUX D'ANTISTAPHYLOLYSINE GAMMA

chez les lapins ayant reçu 100 M de germes en infection osseuse articulaire

(résultats exprimés en inverse de dilution)

N° LAPIN	10	1 S	2 S	3 S	4 S	5 S	6 S	7 S	8 S	9 S	10 S	11 S	12 S	13 S	14 S	15 S	16 S
351	20	80	640	640	1.280	640	1.280	1.280	1.280	1.280	1.280	1.280	1.280	640	640	160	80
352	20	40	320	160	160	160	640										
353	20	40	320	640	640	640	1.280										
354	10	80	160	160	160	160	160	320	320	160	80	80	80	80	80	80	80
355	20	40	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80	80
356	10	40	40	40	80	80	80	80	80	80	80	80	320	640	1.280	640	640
357	10	20	80	160	160	160	160	160	160	160	160	160	160	80	160	640	640
358	20	80	160	160	160	160	160	160	80	80	80	80	80	80	80	80	80
359	20	80	80	80	320	320	320	320	80	160	160	160	160	80	320	320	320
360	10	20	80	80	160	160	80	40	40	40	20	20	20	20	20	10	10
Moyenne :	16	52	136	220	320	256	424	456	365	255	242,5	242,5	272,5	212,5	332,5	251,25	141,25
écart-type																	
V	5,16	25,3	185,18	225,68	375,28	212,66	481,55	477,94	419,48	416,35	421,75	421,75	417,05	264,66	482	256,76	161,31

TAUX D'ANTISTAPHYLOLYSINE GAMMA

chez les lapins ayant reçu 500 millions de germes en injection ostéo-articulaire
(résultats exprimés en inverse de dilution)

N° LAPIN	J 0	1 S	2 S	3 S	4 S	5 S	6 S	7 S	8 S	9 S	10 S	11 S	12 S	13 S	14 S	15 S	16 S
341	10	80	80	160	160	160	80	80	40	40	40						
342	10	160	160	160	80	80	80										
343	40	640	640	1280	1280	1280	1280										
344	20	80	320	640													
345	20	40	40	80	160	160	80	160	160	160	160	160	80				
346	80	160	320	320	320	320	320	320	320	160	160	160	160	160	160	640	640
347	40	80	80	40	80	80	160	160	160	320							
348	20	40	40	160													
349	20	80	80	80	160	160	160	160	320	320							
350	20	80	320	1280	1280	1280	1280	1280	320	320	320	160					
Moyenne :	22	136	192	420	462,2	430	430	360	220	220	170	160	120				
Ecart-type $\sqrt{\frac{\sum x^2}{n} - \bar{x}^2}$	10,32	180,07	188,37	383,60	494,4	530,5	530,5	457,47	117,98	117,98	114,9	0	56,56				

3.2.3. DISCUSSION -

La souche Smith R5 ne présente pas de toxicité importante vis-à-vis du lapin puisque, au cours de cette expérimentation, la létalité se présente de la manière suivante, 8 semaines après l'inoculation :

- Lapins - O.A. -	50 millions	= 1 mort sur 5
"	100 millions	= 2 morts sur 10
"	200 millions	= 2 morts sur 10
"	500 millions	= 4 morts sur 10

Une ostéo-arthrite expérimentale staphylococcique chez le lapin induit une réponse immunitaire sous forme d'anticorps anti-hémolysine gamma.

L'apparition d'une montée des anticorps anti-gamma-hémolysine est évidente dès la première semaine. Dans les groupes ayant reçu 50, 100, 200, 500 millions de germes, l'élévation est rapide et s'étend approximativement de la troisième à la septième semaine, puis le taux baisse progressivement mais reste supérieur au taux de départ (taux moyen ASTL gamma x 12), comme il apparaît sur les figures N° 6, 7, 8, 9.

On note une remontée des anticorps anti-gamma-hémolysine à la quatorzième semaine chez les lapins survivants (9 lapins). Le taux reste élevé et, à la dix-septième semaine, une reinoculation de 200 millions de germes en injections ostéo-articulaires détermine la mort de 5 animaux reinoculés, dans les jours qui suivent. Pour ces 5 lapins, la situation s'est présentée de la manière suivante :

<u>Lapin N°</u>	<u>ASTL gamma</u>	<u>Nombre de germes O.A.</u>	<u>Heures de survie</u>
346	640	200 M	48
356	640	200 M	48
357	640	200 M	72
359	320	200 M	72
360	10	200 M	92

La mort de ces lapins semble attribuable à une réaction d'hypersensibilité liée soit à un taux résiduel d'anticorps important, soit à une sensibilisation (lapin N° 360). L'autopsie de ces lapins n'a pas pu être faite.

Très récemment, KUREK a communiqué les résultats obtenus au cours d'une ostéomyélite expérimentale chez 23 lapins ayant reçu 15 milliards de *Staphylococcus aureus* isolé d'une ostéomyélite humaine et mis en suspension dans la lanoline. Les 23 lapins ont développé une montée d'anticorps anti-gamma-hémolysine importante qui, évaluée à la quatrième semaine en multiple du taux initial d'anticorps, s'étage de 2 à 64 fois pour les lapins ayant répondu ; 3 lapins n'ont développé aucune réponse (104).

Les résultats que nous avons obtenus dans notre expérimentation, évalués de la même manière, ont été réunis dans le tableau N° XXXIV.

Ce tableau montre que la réponse n'est pas corrélée avec le nombre de germes inoculés, et l'on remarque que le moins bon répondeur a néanmoins multiplié par 4 son taux d'anticorps. On doit noter que la souche Smith R5 que nous avons utilisée est une souche sélectionnée pour son aptitude à la sécrétion de gamma-hémolysine.

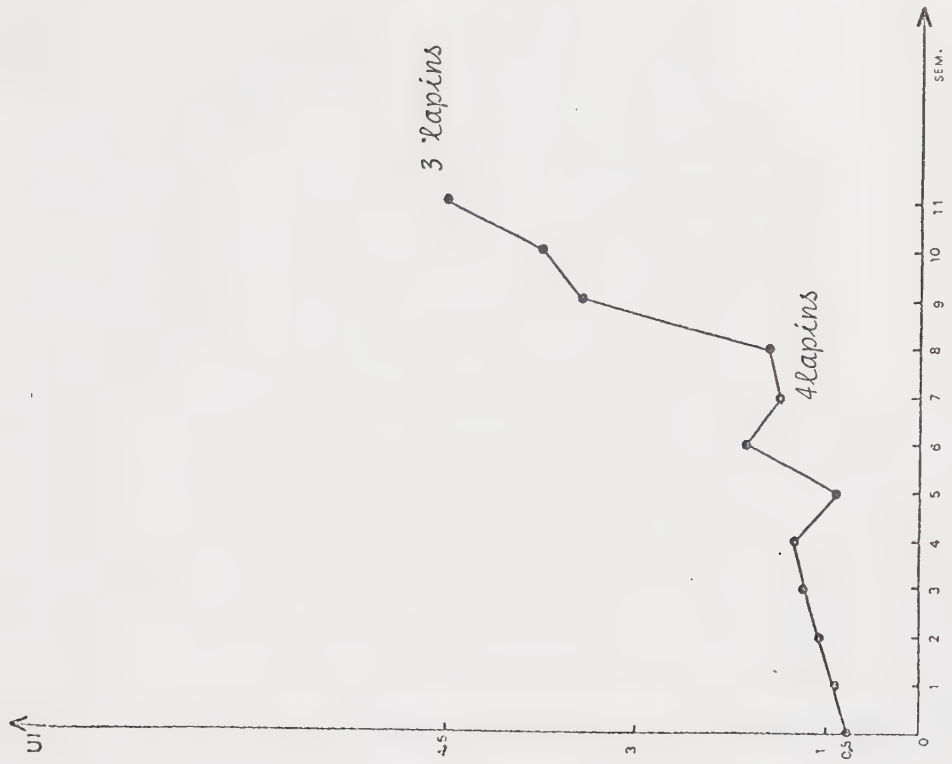
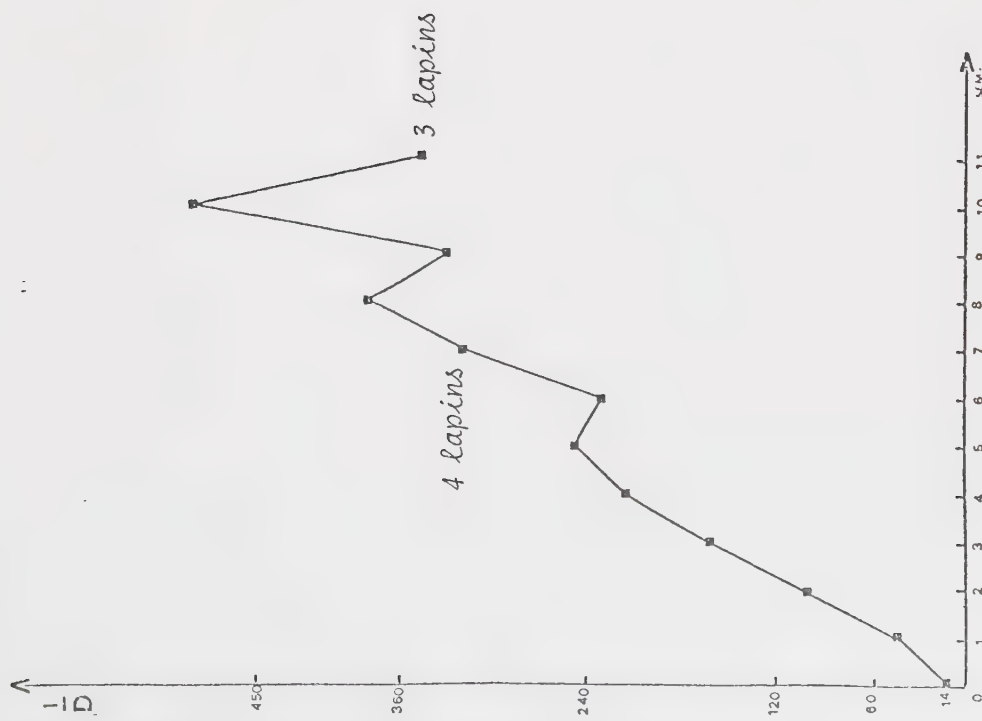


Figure 6
Taux des anti-staphylocoques gamma et alpha
chez les lapins ayant reçu 50 millions de germes en I.O.A. (moyenne de 5 lapins)

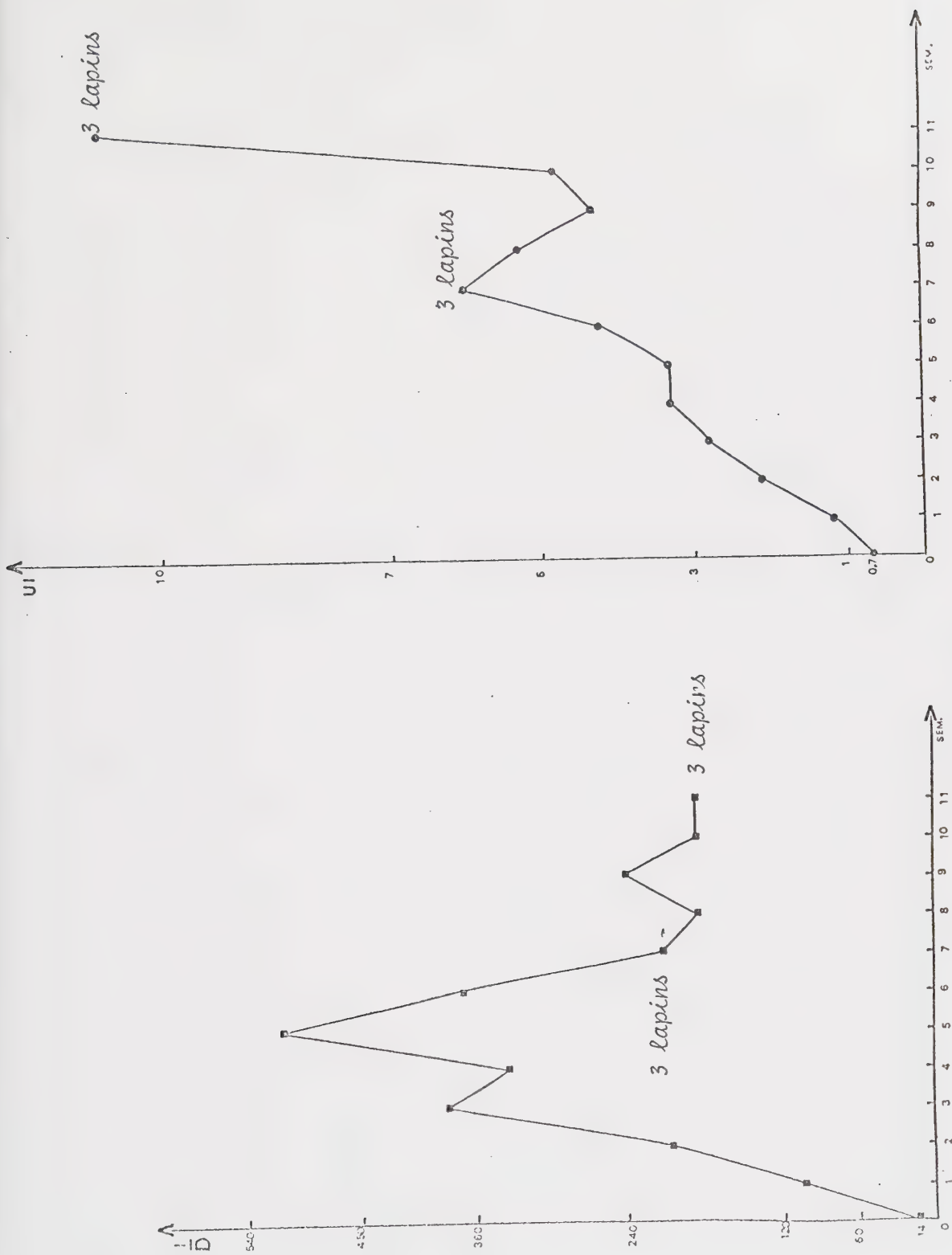


Figure 7

Taux des antistaphylococcal gamma et alpha
chez les lapins ayant reçu 100 millions de germes en I.O.A. (moyenne de 5 lapins)

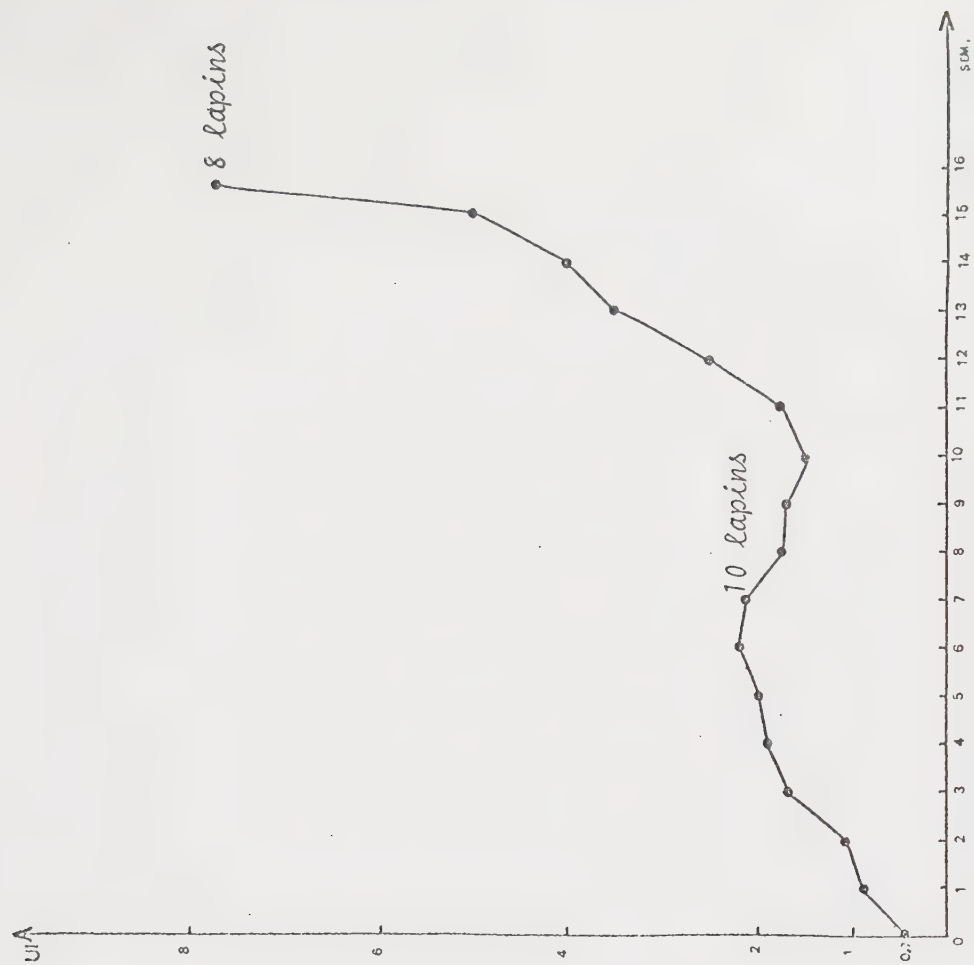
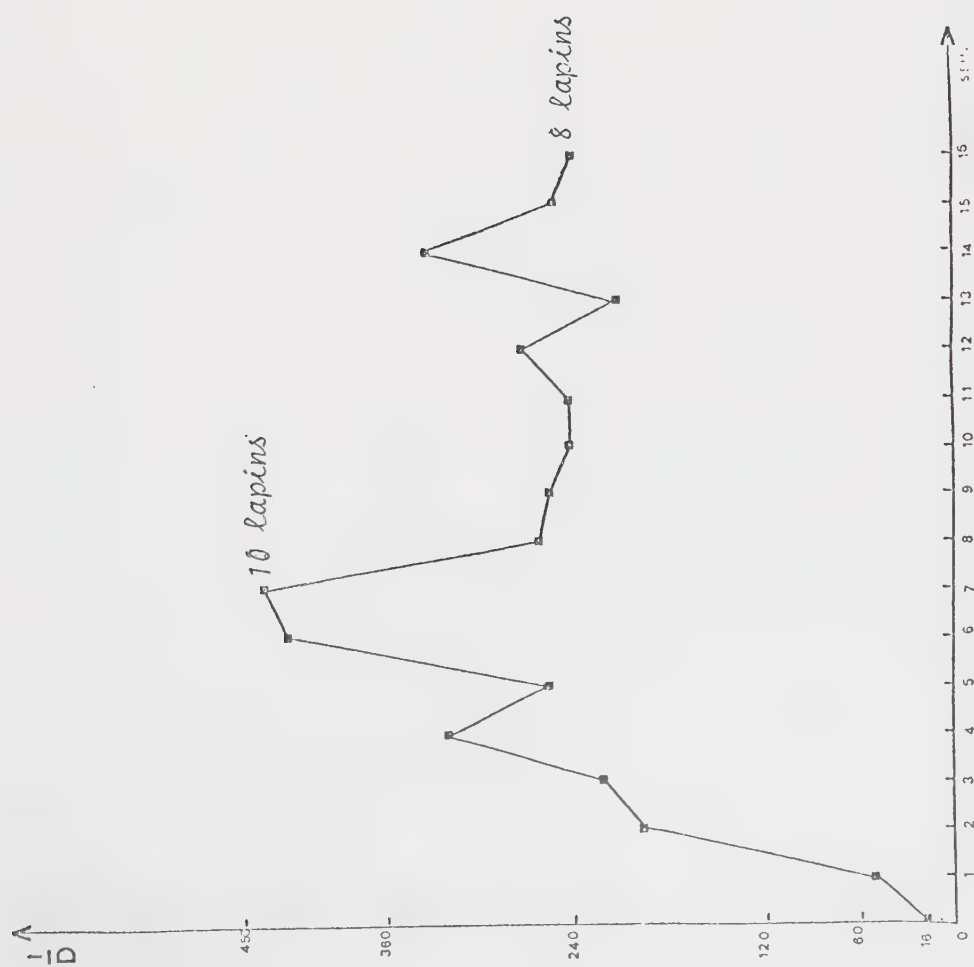


Figure 8

Taux des antistaphylolysines gamma et alpha

chez les lapins ayant reçu 200 millions de germes en I.O.A. (moyenne de 10 lapins)

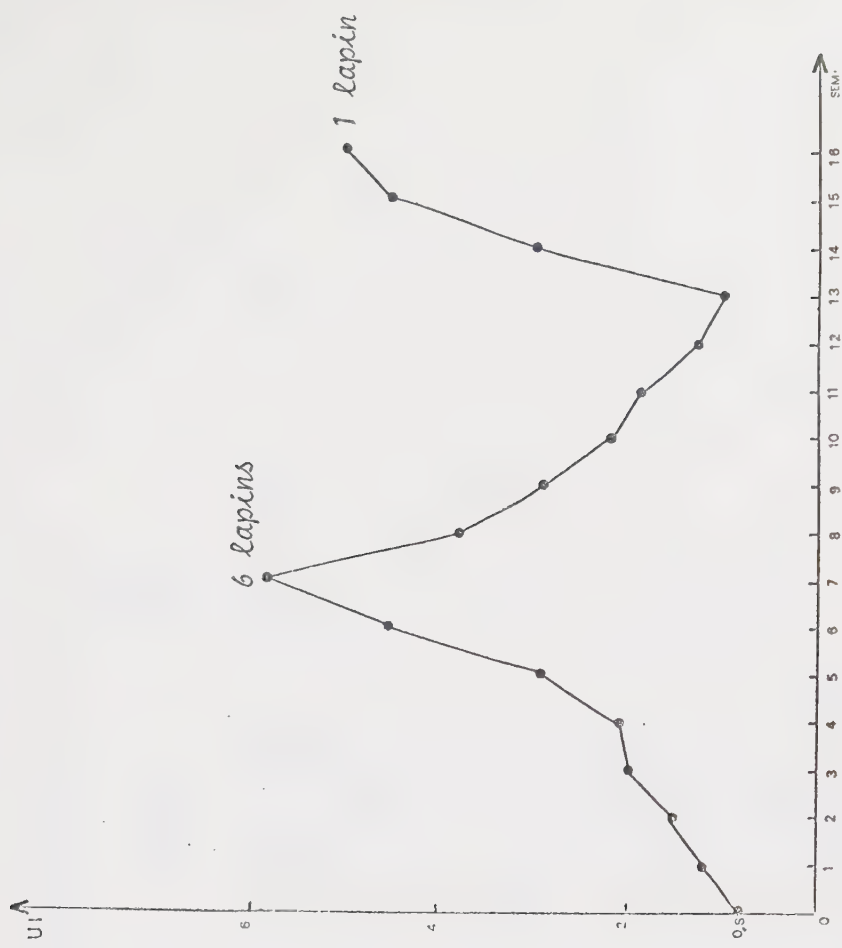
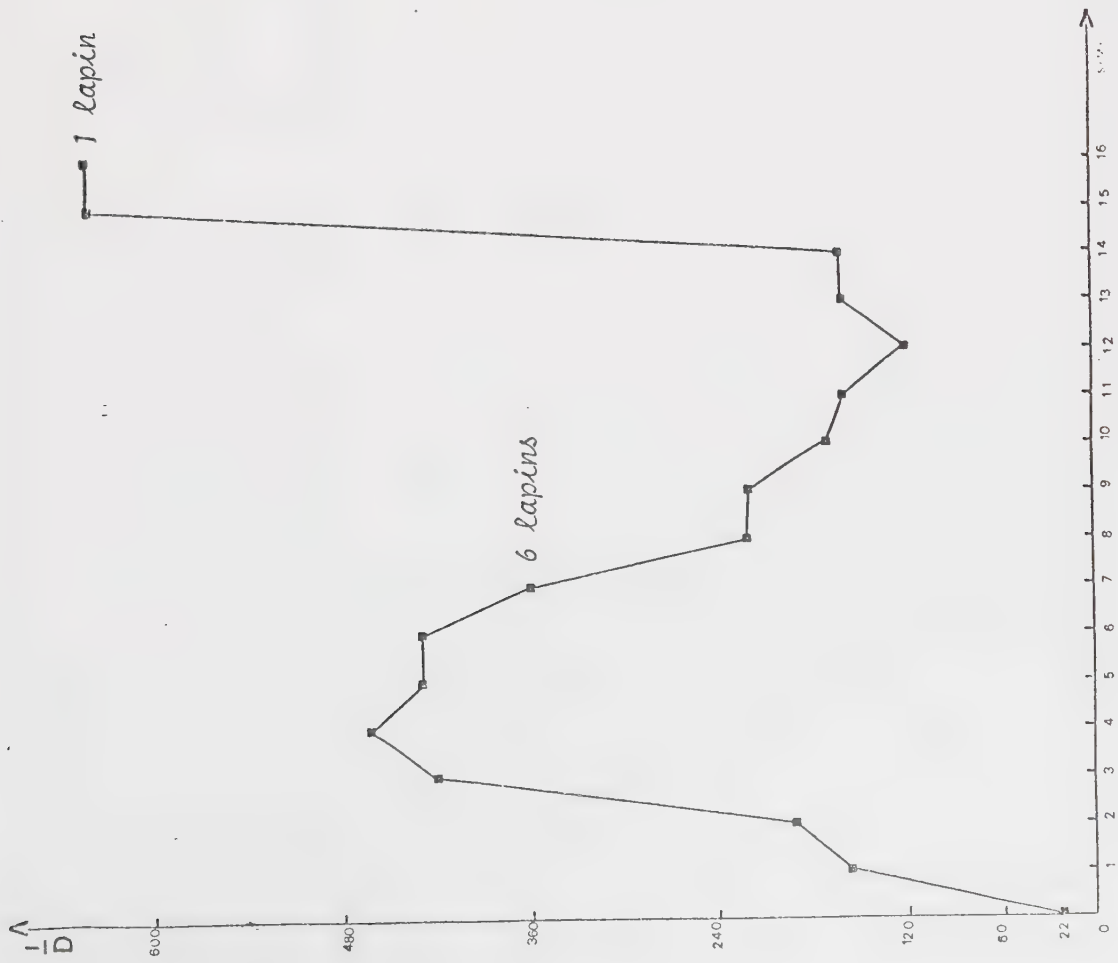


Figure 9

Taux des antistaphylococcal gamma et alpha
chez les lapins ayant reçu 500 millions de germes en I.O.A. (moyenne de 10 lapins)

- TABLEAU XXXIV -

AUGMENTATION DU TAUX D'ANTI-GAMMA-HEMOLYSINE
chez 30 lapins inoculés en ostéo-articulaire

x TAUX INITIAL	NOMBRE DE GERMES INOCULES			
	50 M	100 M	200 M	500 M
128	0	1	1	0
64	2	2	3	1
32	2		2	3
16	0	2	2	4
8	1		1	2
4	0		1	0
Nombre de lapins	5	5	10	10

L'ensemble de ces résultats confirme que le *Staphylococcus aureus* peut produire de la gamma-hémolysine in vivo dans l'os infecté, qui est elle-même source d'une réponse immunitaire, et peut jouer un rôle dans la pathogénèse de l'ostéomyélite.

3.2.4. ROLE DES IMMUNO-STIMULANTS DANS L'IMMUNISATION OSTEO-ARTICULAIRE -

A la suite de cette expérimentation, il a paru intéressant de préciser quelle pouvait être l'interaction d'un adjuvant dans ce mode d'immunisation à localisation antigénique intra-osseuse.

Une immunisation ostéo-articulaire avec 200 millions de staphylocoque Smith R5 est donc pratiquée en présence de 1 ml d'adjuvant complet de Freund I.P.L. (6 lapins), de 1 mg de M.D.P. = N-acétyl-muramyl-L-alanyl-D)isoglutamine de l'Institut Pasteur de Paris (6 lapins). 5 lapins témoins ont reçu 200 millions de germes de la même suspension, mais sans adjuvant.

Les résultats figurent dans les tableaux N° XXXV et XXXVI.

L'expérimentation ne portant actuellement que sur 4 semaines, les résultats sont encore difficilement interprétables puisque la réponse humorale à l'inoculation ostéo-articulaire s'étage sur un nombre de semaines important. Néanmoins, après 4 semaines d'observation, l'élévation des anticorps anti-gamma-hémolysine (et non pas anti-alpha-hémolysine) est sensiblement plus importante dans le groupe de lapins ayant reçu de l'adjuvant complet de Freund ; l'adjuvant M.D.P., par contre, ne paraît pas avoir d'activité stimulante, tout au moins dans cette première période.

- TABLEAU XXXV -

TAUX D'ANTISTAPHYLOLYSINE GAMMA

chez les lapins ayant reçu 200 millions de germes en injection ostéo-articulaire
en présence de différents adjuvants

	LAPIN N°	J 0	1 S	2 S	3 S	4 S
200 millions de germes en O.A.	324	10	40	160	160	320
	325	20	40	80	80	80
	326	20	40	80	160	160
	327	10	40	80	80	80
	328	10	80	160	640	1.280
	$\bar{x}$ moyen	14	48	112	224	384
200 millions de germes en O.A. + 1 ml de Freund complet	311	20	40	160	320	320
	312	20	20	320	320	160
	315	10	40	160	160	160
	316	20	80	160	160	160
	319	20	40	320	320	160
	320	20	40	160	80	80
	$\bar{x}$ moyen	18	26	213	226	173
200 millions de germes en O.A. + 1 ml de M.D.P.	313	20	40	160	160	160
	314	20	20	40	20	40
	317	20	40	320	320	640
	318	20	40	80	80	80
	321	10	40	80	80	80
	322	10	10	10	10	20
	$\bar{x}$ moyen	16	31	116	111	170

J.O. = avant l'inoculation ; S = semaine après l'inoculation ;

O.A. = ostéo-articulaire.

- TABLEAU XXXVI -

TAUX D'ANTISTAPHYLOLYSINE ALPHA

chez les lapins ayant reçu 200 millions de germes en injection ostéo-articulaire
en présence de différents adjuvants

	LAPIN N°	J 0	1 S	2 S	3 S	4 S
200 millions de germes en O.A.	324	0,9	2,25	4,0	3,5	3,5
	325	<0,7	<0,7	0,7	0,7	<0,7
	326	<0,7	0,7	0,95	0,7	<0,7
	327	<0,7	<0,7	0,7	2,95	2,1
	328	0,7	0,9	2,0	3,0	4,5
	$\bar{x}$ moyen	0,7	1,05	1,67	2,0	2,3
200 millions de germes en O.A. + 1 ml de Freund complet	311	<0,7	<0,7	4,0	5,25	4,5
	312	<0,7	0,85	0,8	0,7	<0,7
	315	<0,7	1,05	3,5	5,0	4,0
	316	<0,7	<0,7	0,7	<0,7	0,7
	319	<0,7	<0,7	5,0	5,25	4,0
	320	<0,7	<0,7	0,75	1,5	2,25
	$\bar{x}$ moyen	<0,7	0,75	2,4	3,0	2,6
200 millions de germes en O.A. + 1 ml de M.D.P.	313	<0,7	<0,7	2,14	1,35	1,4
	314	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	0,7
	317	<0,7	0,75	2,02	3,01	2,25
	318	<0,75	0,9	3,15	0,8	0,75
	321	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	0,7
	322	<0,7	<0,7	0,7	<0,7	0,7
	$\bar{x}$ moyen	<0,7	0,7	1,5	1,2	1,5

J.O. = avant l'inoculation ; S = semaine après l'inoculation ;
O.A. = ostéo-articulaire.

3.3. ETUDE COMPARATIVE DE LA REPONSE
EN ANTICORPS ANTI-GAMMA et ANTI-ALPHA-HEMOLYSINE STAPHYLOCOCCIQUE
AU COURS DE L'OSTEO-ARTHRITE EXPERIMENTALE DU LAPIN

La réponse sérologique en anticorps anti-alpha-hémolysine a été également suivie chez les 30 lapins ayant reçu en injections ostéo-articulaires 50, 100, 200 et 500 millions de germes.

3.3.1. RESULTATS -

Nous avons enregistré une élévation du taux d'anti-alpha-hémolysine chez 21 sur 30 lapins, confirmant l'expérimentation conduite précédemment par QUENEAU et ses collaborateurs, qui ont montré que l'inoculation intra-articulaire, intra-osseuse ou ostéo-articulaire, détermine une ostéo-arthrite septique par inoculation de *Staphylococcus aureus* isolés chez l'homme et que celle-ci est accompagnée d'une élévation d'anticorps anti-alpha-hémolysine (133).

Les résultats figurent dans les tableaux N° XXXVII à XL.

TAUX D'ANTISTAPHYLOLYSINE ALPHA
chez les lapins ayant reçu 50 millions de germes en injection. ostéo-articulaire
(résultats exprimés en unités internationales)

N° LAPIN	J 0	1 S	2 S	3 S	4 S	5 S	6 S	7 S	8 S	9 S	10 S	11 S
266	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	0,9	0,9					
267	0,9	0,9	0,9	1,6	1,05	0,7	0,9	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7
268	0,8	0,8	<0,7	<0,7	0,9	1,2	2,8	3,2	3,6	9,3	11,2	13
269	<0,7	0,8	0,8	0,85	<0,7	<0,7	<0,7	0,9	0,9	0,9	<0,7	<0,7
270	0,8	1,3	2,2	1,5	1,5	1	1	1,1	1	2,2	3,4	3,4
Moyenne : $\bar{x}$	0,78	0,9	1,06	1,21	1,29	0,9	1,82	1,475	1,55	3,6	4	4,45

- TABLEAU XXXVIII -

TAUX D'ANTISTAPHYLOLYSINE ALPHA

chez les lapins ayant reçu 100 millions de germes en injection ostéo-articulaire
(résultats exprimés en unités internationales)

N° LAPIN	J 0	1 S	2 S	3 S	4 S	5 S	6 S	7 S	8 S	9 S	10 S	11 S
264	<0,7	0,9	1,5	2,2	2,25	2,5						
272	<0,7	2,8	5	3,4	5,5	4,5	3,65	3,3	3,6	4	5,5	
273	<0,7	0,85	2,3	2,5	3,7	4,5	4,5	10,12	8,43	5	4,7	5,5
274	<0,7	0,7	1	3	4	4	4,5	4,5	3,8	4	4	16
275	<0,7	<0,7	<0,7	2,25	0,95	0,9						
Moyenne : $\bar{x}$	<0,7	1,19	2,1	2,67	3,28	3,28	4,216	5,97	5,27	4,3	4,733	10,75
Ecart-type $\sqrt{\sigma}$	0	0,9	1,73	0,516	1,74	1,56	0,49	3,64	2,7	0,57	0,75	7,4

TAUX D'ANTISTAPHYLOLYSINE ALPHA

chez les lapins ayant reçu 200 millions de germes en injection ostéo-articulaire
(résultats exprimés en unités internationales)

N° LAPIN	J 0	1 S	2 S	3 S	4 S	5 S	6 S	7 S	8 S	9 S	10 S	11 S	12 S	13 S	14 S	15 S	16 S
351	< 0,7	< 0,7	< 0,7	5,5	5	3	3,7	3,5	2,5	2	1,5	1,1	1,05	0,7	0,7	0,7	0,7
352	< 0,7	< 0,7	< 0,7	2,25	3,35	3,35	0,7	2,5									
353	< 0,7	0,7	< 0,7	0,7	0,8	< 0,7	< 0,7	0,7									
354	0,75	0,75	0,8	1,2	0,85	4,25	6	7,5	6	5,75	4,5	5,5	3,68	3			
355	< 0,7	0,8	0,8	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7
356	< 0,7	< 0,7	1,5	1,5	1,35	1	0,9	0,95	0,75	< 0,7	< 0,7	2,7	10,12	18,97	21,50	14,4	41,8
357	< 0,7	< 0,7	< 0,7	0,75	0,7	0,9	1,1	0,8	< 0,7	< 0,7	0,7	0,7	0,75	0,7	1,35	0,7	0,7
358	< 0,7	2,7	2,8	2,25	1,2	1,5	1,4	1,1	1	1,35	1,4	1	1,5	1	1,5	1,5	1,5
359	< 0,7	1,1	1,7	1,4	4,75	3,85	6	3	1,6	1,6	1,6	1,65	1,6	1,7	1,6	1,6	
360	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7	< 0,7
Moyenne : $\bar{x}$	0,7	0,955	1,11	1,695	1,94	1,995	2,19	2,14	1,74	1,68	1,47	1,75	2,5	3,43	4	2,90	7,68
Ecart-type $\sqrt{s}$	0,015	0,625	0,69	1,46	1,73	1,44	2,2	2,15	1,83	1,71	1,28	1,65	3,2	6,32	7,72	5,08	16,71

TAUX D'ANTISTAPHYLOLYSINE ALPHA

chez les lapins ayant reçu 500 millions de germes en injection ostéo-articulaire
(résultats exprimés en unités internationales)

N° LAPIN	J 0	1 S	2 S	3 S	4 S	5 S	6 S	7 S	8 S	9 S	10 S	11 S	12 S	13 S	14 S	15 S	16 S
341	0,7	0,7	1,5	7,25	6,75	5,75	6	5,25	3,7	3,7	2,3						
342	0,7	1,6	2,25	1,3	0,9	0,8	1										
343	0,7	0,7	0,7	1,35	2	8,43	15,18	22,77									
344	0,75	0,95	0,9	0,9													
345	0,9	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	1,35	1,9	2,1	2	2	1,8	1,9				
346	0,7	0,75	1,35	0,85	0,85	0,85	1,3	0,85	2,1	1,1	1,35	0,85	0,85	1,05	3	4,5	5
347	0,7	0,7	0,8	0,9	0,9	0,85	0,85	0,85	1,4	1,5							
348	0,7	0,7	0,7	2,5	3												
349	1,35	3,2	3,1	2,85	2,85	2,1	1,9	2,1	8,43	5,62							
350	0,7	2,25	3,35	2,25	2	3,35	7,9	6,75	4,75	3,5	3,2	3,1					
Moyenne : $\bar{x}$	0,79	1,225	1,535	2,08	2,20	2,85	4,43	5,78	3,74	2,84	2,21	1,9	1,37				
Ecart-type $\sqrt{\sigma}$	0,20	0,867	1,017	1,968	1,913	2,858	5,075	7,86	2,60	1,70	0,768	1,129	0,742				

3.3.2. DISCUSSION -

L'étude comparative des courbes d'élévation des anti-hémolysines gamma et alpha peut être faite sur le tableau N° XLI et les figures N° 6, 7, 8, 9.

Les deux réponses y apparaissent non superposables quel que soit le nombre de germes injectés. L'élévation en anti-gamma-hémolysine est plus précoce, plus rapide que celle en anti-alpha-hémolysine. Les maxima des deux réponses se situent approximativement entre les quatrième et septième semaines, mais quelques lapins ne répondent que très tardivement en anti-alpha-hémolysine. La réponse en anti-alpha-hémolysine, comparativement au taux d'anticorps initial, est beaucoup moins importante, comme le montre le tableau N° XLII.

Le caractère hétérogène reconnue à la réponse à une immunisation est retrouvé dans cette expérimentation, tout au moins en ce qui concerne l'alpha-hémolysine, puisque 30 % des lapins n'ont pas présenté d'élévation du taux d'anti-alpha-hémolysine et que la réponse des autres n'est pas corrélée avec le nombre de germes inoculés.

Par contre, tous les lapins, sans exception, ont augmenté leur taux d'anti-gamma-hémolysine, et 25 lapins (soit 83 %) ont multiplié leur taux de 16 à 128 fois en plusieurs semaines.

- TABLEAU XLI -

TAUX MOYENS D'ANTISTAPHYLOLYSINE ALPHA ET GAMMA

obtenus chez les lapins ayant reçu en injection ostéo-articulaire
50, 100, 200, 500 millions de germes de Staphylococcus aureus "souche Smith R5"

NOMBRE DE GERMES	TAUX ASTL	J 0	1 S	2 S	3 S	4 S	5 S	6 S	7 S	8 S	9 S	10 S	11 S	12 S	13 S	14 S	15 S	16 S
5 LAPINS 50 millions	gamma	14	42	88	164	216	248	232	320	380	330	490	346					
	alpha	0,78	0,9	1,06	1,21	1,29	0,9	1,82	1,48	1,55	3,6	4	4,45					
5 LAPINS 100 millions	gamma	14	104	208	384	336	512	373	213	186	240	187	187					
	alpha	<0,7	1,19	2,1	2,67	3,28	3,28	4,22	5,97	5,27	4,3	4,73	10,75					
10 LAPINS 200 millions	gamma	16	52	196	220	320	256	424	436	265	255	243	243	273	213	332	251	241
	alpha	<0,7	0,95	1,11	1,69	1,94	1,99	2,19	2,14	1,74	1,68	1,47	1,75	2,5	3,43	4	2,90	7,68
10 LAPINS 500 millions	gamma	22	136	192	420	462	430	430	360	220	220	170	160	120	160	160	640	640
	alpha	0,79	1,23	1,54	2,08	2,2	2,85	4,43	5,78	3,74	2,84	2,21	1,9	1,37	1,05	3	4,5	5

- TABLEAU XLII -

AUGMENTATION DU TAUX DES ANTI-GAMMA et ANTI-ALPHA HEMOLYSINE
chez 30 lapins inoculés en ostéo-articulaire

x TAUX INITIAL	ASTL GAMMA	ASTL ALPHA
128	2	0
64	8	1
50	0	1
32	7	1
16	8	1
14	0	1
12	0	1
10	0	1
8	4	3
6	0	1
5	0	2
4	1	4
3	0	4
2	0	0
1	0	9
	30 lapins	

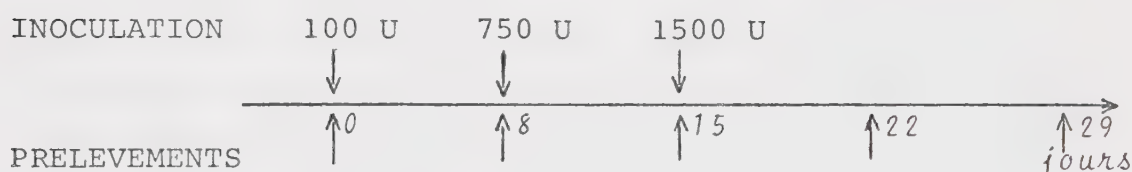
3.4. ETUDE DE L'ACTIVITE IMMUNOGENE DE LA GAMMA-HEMOLYSINE

PLOMMET a montré que des lapins pouvaient être immunisés par injection sous-cutanée de gamma-hémolysine en présence d'adjuvant complet de Freund, et qu'une activité neutralisante de celle-ci apparaît dans le sérum des lapins inoculés (71, 51).

Au cours de notre expérimentation animale, nous avons confirmé l'activité immunogène de la gamma-hémolysine préparée au cours de notre travail.

3.4.1. PROTOCOLE EXPERIMENTAL -

Neuf lapins reçoivent une inoculation de gamma-hémolysine purifiée (lot B) en injections sous-cutanées, selon la chronologie suivante :



Pour 4 d'entre eux, aux jours J 0 et J 15, l'inoculation est accompagnée d'une injection de 1 mg de M.D.P. et, pour 3 d'entre eux, de 1 ml d'adjuvant complet de Freund. Les deux autres ne reçoivent que la gamma-hémolysine.

Un témoin "adjuvant complet de Freund", un témoin "M.D.P.", reçoivent uniquement l'immuno-stimulant aux jours 0 et 15.

L'adjuvant complet de Freund provient du laboratoire d'Immunologie, il comporte 0,1 mg de bacilles de Koch tués par ml. Le M.D.P. de l'Institut Pasteur de Paris est utilisé en solution aqueuse à la dose conseillée pour le lapin (30). Ils sont injectés avec l'antigène.

3.4.2. RESULTATS -

Les résultats figurent dans le tableau N° XLIII.

3.4.3. DISCUSSION -

La dose de gamma-hémolysine (2.350 unités en 15 jours) correspond à une dose intermédiaire de celles utilisées par PLOMMET. Celui-ci n'a pas précisé la valeur de l'activité neutralisante des deux sérums obtenus, ce qui ne nous permet pas de comparaison.

Les deux stimulants testés de notre expérimentation appartiennent à des classes différentes, et leur inter réaction dans la réponse immunitaire ne répond pas du même mécanisme. L'adjuvant complet de Freund active à la fois la réponse humorale et facilite l'induction de l'hypersensibilité retardée, alors que, selon CHEDID, le M.D.P. augmente la réponse humorale (58, 10 30).

La gamma-hémolysine injectée seule par voie sous-cutanée est peu immunogène aux doses utilisées.

L'adjuvant complet de Freund augmente considérablement la réponse en anti-gamma-hémolysine chez les 3 lapins. La stimulation par le M.D.P. est encore

plus remarquable, mais la présence d'un taux très élevé d'anti-gamma-hémolysine après deux injections déclenche la mort de 3 sur 4 animaux à la troisième injection, et ceci dans les heures qui suivent. Le lapin survivant a multiplié par 100 son taux initial d'anti-gamma-hémolysine qui a passé de 20 à 2.560. L'activité stimulante du M.D.P. sur la synthèse des anticorps est donc confirmée, et ceci pour une dose unique d'immuno-stimulant.

Le témoin "M.D.P." conserve son titre inchangé et la reinoculation de l'adjuvant est sans conséquence.

Le lapin N° 398 qui n'a reçu que de l'adjuvant complet de Freund présente une montée d'anticorps anti-gamma-hémolysine (320) et anti-alpha-hémolysine (4 U). De même, seuls de tous les lapins immunisés, les lapins N° 395 et 396 qui ont reçu la gamma-hémolysine accompagnée d'adjuvant complet de Freund ont présenté une montée d'anticorps anti-alpha-hémolysine. Ces réponses sont particulièrement intéressantes, car elles confirment l'activité immunostimulante non spécifique des extraits de mycobactéries.

Les lapins immunisés avec la gamma-hémolysine seule ou avec du M.D.P. n'ont pas donné de réponse en anti-alpha-hémolysine, confirmant ainsi la spécificité de la gamma-hémolysine injectée. Le lapin N° 393 qui atteint le titre de 2.560 en anti-gamma-hémolysine a été saigné à blanc et son sérum stocké à -30°C. Une chromatographie est en cours pour déterminer à quelle classe d'immunoglobulines appartient l'activité neutralisante.

TAUX DES ANTICORPS ANTI-GAMMA et ANTI-ALPHA-HEMOLYSINE

chez 10 lapins ayant reçu 3 injections sous-cutanées de gamma-hémolysine

	LAPIN N°	ASTL GAMMA en inverse de dilution					ASTL ALPHA en unités internationales				
		J 0	8 J	15 J	22 J	29 J	J 0	8 J	15 J	22 J	29 J
toxine gamma + adjuvant M.D.P.	391	20	320	1280	mort	mort	<0,7	<0,7	<0,7	mort	mort
	392	10	40	640	mort	mort	0,7	<0,7	<0,7	mort	mort
	393	20	80	1280	1280	2560	<0,7	<0,7	0,7	<0,7	0,9
	394	20	40	160	mort	mort	<0,7	<0,7	<0,7	mort	mort
témoin M.D.P.	401	20	20	10	20	10	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7
	395	20	20	320	320	320	<0,7	0,7	0,7	0,9	3,75
	396	20	80	160	320	640	<0,7	0,7	0,7	0,9	5,0
	397	20	40	160	320	640	<0,7	0,7	<0,7	0,7	<0,7
témoin Freund	398	20	20	20	320	80	<0,7	<0,7	1,5	4,0	3,75
	399	20	40	40	80	40	<0,7	<0,7	<0,7	0,7	<0,7
toxine gamma	400	20	80	80	40	80	<0,7	<0,7	<0,7	<0,7	1,5

C O N C L U S I O N :

Au cours de cette expérimentation animale, nous avons mis en évidence l'existence d'une réponse immune au cours de l'ostéo-arthrite chez le lapin, induite par l'inoculation d'une suspension de staphylocoque Smith R5. Tous les lapins développent une réponse sous forme d'anticorps anti-gamma-hémolysine. L'élévation du taux de ces anticorps est précoce, rapide, durable et importante. Elle s'accompagne d'une réponse en anticorps anti-alpha-hémolysine moins constante, moins rapide et, semble-t-il, moins significative.

Une immunisation par la gamma-hémolysine purifiée en voie sous-cutanée et en présence d'adjuvant détermine exclusivement une élévation d'anticorps neutralisant la gamma-hémolysine, qui prouve la spécificité de la gamma-hémolysine préparée.

4.

ETUDE CLINIQUE

INTRODUCTION :

La dernière partie de notre travail est constituée par une étude du taux des anticorps anti-gamma-hémolysine chez l'homme, et en particulier chez les sujets souffrant d'une infection ostéo-articulaire.

La valeur diagnostique, dans les staphylococcies profondes, du dosage des anticorps anti-alpha-hémolysine a été reconnue et confirmée, mais la négativité du test chez 31 % de sujets porteurs d'une affection bactériologiquement confirmée détermine la limite de ce test.

TAYLOR a présenté le dosage des anticorps anti-gamma-hémolysine comme le test sérologique staphylococcique susceptible de venir compléter l'apport du laboratoire au diagnostic des staphylococcies non bactériologiquement confirmées.

Cette étude a comporté la détermination du taux d'anti-gamma-hémolysine présent dans le sérum de sujets exempts de toute atteinte staphylococcique et, ce taux normal défini, nous avons fait une étude du taux sérique d'anticorps anti-gamma-hémolysine chez des sujets présentant une ostéo-arthrite infectieuse, avec l'intention de préciser l'intérêt diagnostique d'une étude sérologique plus complète.

4.1. MATERIEL ET METHODE

La technique utilisée est celle que nous avons décrite précédemment et appliquée au dosage des anticorps anti-gamma-hémolysine dans notre expérimentation animale.

Les sérums testés ont été stockés à -30°C jusqu'à utilisation et décomplémentation au moment du titrage.

Mis à part les sérums des 30 donneurs du Centre de Transfusion Sanguine, tous les sérums ont été titrés en aveugle, c'est-à-dire sans connaissance du contexte clinique.

Les sujets testés sont des malades provenant pour la plupart du Service de Rhumatologie de l'Hôpital des Charpennes (Professeur LEJEUNE), quelques-uns sont des malades examinés au Centre Hospitalier de Bourg-en-Bresse (Docteur BOCQUET).

Les 45 sujets examinés ont été réunis en 4 groupes :

- GROUPE I :

29 sujets présentant une ostéo-arthrite infectieuse staphylococcique bactériologiquement contrôlée (70 examens).

- GROUPE II :

10 sujets présentant une ostéo-arthrite infectieuse non bactériologiquement contrôlée (46 examens).

- GROUPE III :

3 sujets présentant une ostéo-arthrite infectieuse non staphylococcique, bactériologiquement contrôlée (10 examens).

- GROUPE IV :

13 sujets présentant une infection staphylococcique non ostéo-articulaire, bactériologiquement contrôlée (22 examens).

4.2. DETERMINATION DU TAUX NORMAL

D'ANTI-GAMMA-HEMOLYSINE

Dans un premier temps, nous avons déterminé la valeur du taux normal sérique de l'adulte sain. Pour cela, deux groupes de témoins ont été constitués. Le premier groupe comporte 30 adultes, hommes ou femmes, donneurs au Centre de Transfusion Sanguine de Lyon. Le deuxième groupe comporte 34 adultes prélevés au Pavillon d'urgence de l'Hôpital Bellevue à Saint-Etienne (Professeur QUENEAU), sujets jeunes, sains, sans affection staphylococcique connue.

Les résultats de ces 64 titrages figurent dans les tableaux N° XLIV et XLV.

Sur les 64 témoins étudiés, 54 présentent un taux d'anti-gamma-hémolysine décelable mais faible (de 20 à 80). 7 témoins, soit 10 %, présentent un titre de 160. Nous considérons donc comme douteux un titre trouvé à 160, et positif tout titre supérieur à 160.

Ces résultats concordent parfaitement avec ceux donnés par TAYLOR (159) qui considère également comme limite la dilution au 1/160.

Ces mêmes témoins ont été testés en anti-alpha-hémolysine, et nos résultats sont en accord avec les taux normaux observés dans les études précédentes (135). Le taux normal d'anti-alpha-hémolysine est inférieur à 2 unités ; un titre de 2 unités est considéré comme douteux.

- TABLEAU XLIV -

TAUX DES ANTISTAPHYLOLYSINES ALPHA ET GAMMA
chez 30 sujets sains "donneurs de sang au C.T.S. de Lyon"

SUJETS	ASTL ALPHA en U. I.	ASTL GAMMA en inverse de dilution	SUJETS	ASTL ALPHA en U. I.	ASTL GAMMA en inverse de dilution
N° 1	0,7	20	N° 16	<0,7	40
N° 2	0,7	40	N° 17	0,7	40
N° 3	0,7	20	N° 18	0,7	40
N° 4	<0,7	40	N° 19	2,25	160
N° 5	0,9	160	N° 20	0,8	40
N° 6	<0,7	40	N° 21	0,7	40
N° 7	0,8	40	N° 22	0,8	40
N° 8	<0,7	40	N° 23	0,7	40
N° 9	0,7	40	N° 24	0,7	40
N° 10	0,9	160	N° 25	1,35	40
N° 11	0,7	40	N° 26	1,65	40
N° 12	0,7	40	N° 27	0,8	80
N° 13	0,7	20	N° 28	1,1	80
N° 14	0,7	160	N° 29	0,8	80
N° 15	0,7	40	N° 30	0,8	80

- TABLEAU XLV -

TAUX DES ANTISTAPHYLOLYSINES ALPHA ET GAMMA
chez 34 sujets sains adultes

SUJETS	ASTL ALPHA en U. I.	ASTL GAMMA en inverse de dilution	SUJETS	ASTL ALPHA en U. I.	ASTL GAMMA en inverse de dilution
GRA...	0,8	80	VAR...	<0,7	40
GHI...	0,85	80	SOR...	0,9	80
MAS...	0,7	80	LEN...	0,7	40
GAM...	0,7	80	TEX...	0,7	20
VEY...	0,8	80	PAR...	0,75	40
FAV...	1,1	80	MAC...	0,8	80
BOU...	0,8	80	BRU...	0,75	80
FON...	0,8	20	COL...	<0,7	40
TUR...	0,9	160	FRO...	0,8	160
TRI...	<0,7	40	VAL...	0,8	160
FER...	0,8	40	JES...	<0,7	80
VID...	0,9	40	MAJ...	0,8	80
ROC...	0,7	40	PLA...	0,8	80
LYO...	<0,7	80	DEL...	0,75	40
GIL...	<0,7	80	DUR...	<0,7	80
LAF...	0,7	80	TEY...	1,6	80
BOU...	<0,7	40	BOU...	1,5	80

4.3. ETUDE DU TAUX
D'ANTICORPS ANTI-GAMMA-HEMOLYSINE
CHEZ LES SUJETS PRESENTANT
UNE OSTEO-ARTHRITE INFECTIEUSE

Les résultats que nous avons obtenus dans les 4 groupes de sujets étudiés sont réunis dans les tableaux N° XLVI à XLIX.

Dans ces tableaux, nous avons fait figurer les résultats des dosages d'anticorps anti-alpha-hémolysine. Ces dosages ont été effectués au moment du prélèvement. Aussi, avons-nous vérifié la conservation du titre d'anticorps pendant le stockage. La stabilité du titre d'anticorps s'est révélée parfaite.

L'analyse détaillée et l'interprétation clinique de ces résultats figurent dans la thèse de Doctorat en Médecine de M. TITOULET (Lyon, 1977).

Les figures N° 10 et N° 11 montrent la répartition des titres d'anticorps anti-gamma-hémolysine et anti-alpha-hémolysine chez les témoins, et les titres maxima présentés par les sujets des 4 groupes étudiés.

- En ce qui concerne le groupe I, la figure N° 12 met en évidence que dans ce groupe :

20 sujets, soit 69,5 % ont présenté à un moment donné un taux d'anticorps anti-gamma-hémolysine élevé ;

7 sujets ont un titre limite, soit 23,5 %, et
2 sujets sont restés négatifs, soit 7 % ;

- TABLEAU XLVI -

TAUX DES ANTISTAPHYLOLYSINES ALPHA ET GAMMA
chez 29 sujets présentant une ostéo-arthrite staphylococcique
bactériologiquement confirmée
Groupe I

N°	NOM	DATE	ASTL ALPHA en U. I.	ASTL GAMMA en inverse de dilution
1	PER...	28.12.1973	0,8	80
2	PER...	03.01.1974	0,9	160
3	PER...	14.01.1974	0,9	160
4	SON...	09.04.1974	7,5	2.560
5	SON...	29.04.1974	6,4	2.560
6	SON...	08.05.1974	4,5	640
7	SON...	13.05.1974	3,7	1.280
8	SON...	21.06.1974	2,7	320
9	ZAA...	17.01.1977	13,5	1.280
10	ZAA...	24.01.1977	9,6	2.560
11	ZAA...	31.01.1977	9,5	1.280
12	ZAA...	15.02.1977	4,5	640
13	ZAA...	21.02.1977	5,0	640
14	ZAA...	28.02.1977	3,5	1.280
15	ZAA...	07.03.1977	4,25	320
16	PRI...	07.04.1975	6,0	640
17	PRI...	16.04.1975	8,4	320
18	PRI...	23.04.1975	5,2	320
19	PRI...	28.04.1975	5,0	320
20	PRI...	07.05.1975	6,0	640
21	PRI...	08.07.1975	2,02	320
22	PRI...	07.09.1975	2,4	640

- TABLEAU XLVI (suite) -

N°	NOM	DATE	ASTL ALPHA en U. I.	ASTL GAMMA en inverse de dilution
23	PRI...	16.09.1975	1,8	320
24	CHA...	30.11.1973	2,25	160
25	DUR...	07.07.1974	0,7	160
26	DUR...	04.11.1974	0,7	160
27	DUR...	12.11.1974	0,7	80
28	DUR...	20.11.1974	0,7	160
29	DUR...	09.12.1974	0,7	160
30	DUR...	03.01.1975	0,7	80
31	DUR...	05.02.1975	0,7	80
32	MET...	16.06.1976	7,6	640
33	AMS...	03.01.1973	3,1	640
34	AMS...	14.01.1974	3,35	640
35	AMS...	08.02.1974	3,2	640
36	BEN...	26.12.1974	4,0	160
37	BEN...	12.03.1974	3,0	80
38	JUF...	09.07.1973	0,7	80
39	LAR...	28.01.1976	7,5	160
40	LAR...	30.08.1976	3,0	160
41	BET...	19.08.1974	0,9	640
42	DOR...	21.11.1973	0,8	160
43	PET...	12.06.1974	1,35	320
44	PET...	26.06.1974	8,6	1.280
45	FON...	23.10.1974	1,7	40
46	DAC...	26.02.1976	6,3	1.280

- TABLEAU XLVI (fin) -

N°	NOM	DATE	ASTL ALPHA en U. I.	ASTL GAMMA en inverse de dilution
47	DAC...	25.03.1976	5,5	1.280
48	GRA...	07.09.1976	0,85	640
49	TOU...	23.03.1973	300,0	1.280
50	TOU...	28.04.1973	96,0	320
51	TOU...	13.07.1973	53,0	320
52	TAU...	22.06.1976	3,0	1.280
53	ARE...	31.08.1976	40,0	> 2.560
54	ARE...	01.09.1976	40,0	> 2.560
55	ARE...	12.10.1976	10,0	2.560
56	GOU...	05.05.1976	7,5	160
57	GOU...	11.05.1976	7,5	160
58	GOU...	02.06.1976	4,0	80
59	GOU...	09.06.1976	4,25	160
60	CLE...	26.06.1973	18,0	2.560
61	RON...	17.12.1976	0,7	640
62	BRA...	25.02.1977	14,3	320
63	BRA...	11.03.1977	27,0	320
64	JIM...	13.04.1977	38,0	640
65	JIM...	25.04.1977	4,5	640
66	JIM...	09.05.1977	25,3	640
67	NOA...	31.05.1976	8,4	1.280
68	LOD...	21.07.1976	0,8	640
69	ALA...	21.07.1976	9,8	1.280
70	ORT...	21.01.1977	9,6	640

- TABLEAU XLVII -

TAUX DES ANTISTAPHYLOLYSINES ALPHA ET GAMMA
chez 11 sujets présentant une ostéo-arthrite infectieuse
non bactériologiquement confirmée
Groupe II

N°	NOM	DATE	ASTL ALPHA en U. I.	ASTL GAMMA en inverse de dilution
1	SIR...	06.05.1975	0,9	40
2	SIR...	26.08.1975	2,7	40
3	SIR...	23.06.1976	1,0	80
4	BRU...	01.04.1975	4,0	160
5	BRU...	28.07.1975	0,85	40
6	BRU...	22.08.1975	4,0	160
7	BRU...	02.09.1975	4,35	160
8	BRU...	16.09.1975	4,5	160
9	BRU...	23.09.1975	4,0	160
10	RAM...	13.03.1974	4,5	1.280
11	RAM...	18.03.1974	4,0	1.280
12	RAM...	03.04.1974	3,0	1.280
13	RAM...	10.04.1974	2,7	1.280
14	RAM...	09.05.1974	3,0	2.560
15	RAM...	13.05.1974	2,7	1.280
16	RAM...	08.07.1974	1,5	640
17	RAM...	27.02.1976	0,85	640
18	SIR...	04.06.1974	4,5	320
19	SIR...	05.06.1974	6,75	320
20	SIR...	24.06.1974	6,4	160
21	SIR...	04.07.1974	5,25	160

- TABLEAU XLVII (fin) -

N°	NOM	DATE	ASTL ALPHA en U. I.	ASTL GAMMA en inverse de dilution
22	SIR...	11.07.1974	6,0	160
23	SIR...	19.07.1974	3,5	160
24	SIR...	07.08.1974	2,0	160
25	SIR...	03.09.1974	2,8	160
26	SIR...	05.11.1974	2,5	160
27	SIR...	16.03.1976	1,8	160
28	SIR...	22.09.1976	1,5	160
29	MIK...	28.05.1974	<0,7	40
30	MIK...	04.06.1974	<0,7	40
31	MIK...	25.06.1974	<0,7	80
32	MIK...	16.07.1974	0,7	40
33	MIK...	03.12.1974	<0,7	80
34	MIK...	22.10.1974	0,7	40
35	DUP...	12.01.1976	0,85	1.280
36	DUP...	22.12.1976	13,5	2.560
37	DUL...	09.10.1975	17,0	2.560
38	DUL...	22.10.1975	13,5	> 2.560
39	SUL...	26.02.1974	3,35	320
40	DEZ...	17.03.1976	0,8	160
41	DEZ...	29.03.1976	0,8	160
42	DEZ...	11.04.1976	0,7	160
43	DEZ...	26.04.1976	<0,7	160
44	DEZ...	13.05.1976	0,8	160
45	DEZ...	25.06.1976	0,7	160
46	DEZ...	19.08.1976	0,7	160
47	BAC...	07.09.1976	0,8	80

- TABLEAU XLVIII -

TAUX DES ANTISTAPHYLOLYSINES ALPHA ET GAMMA
chez 3 sujets présentant une ostéo-arthrite infectieuse non staphylococcique
bactériologiquement confirmée
Groupe III

N°	NOM	DATE	ASTL ALPHA en U. I.	ASTL GAMMA en inverse de dilution
1	MON...	28.05.1974	2,0	80
2	MON...	17.06.1974	1,6	80
3	ALL...	13.07.1973	6,4	2.560
4	ALL...	25.07.1973	6,0	1.280
5	ALL...	30.10.1973	1,9	640
6	ALL...	15.01.1974	0,9	320
7	ALL...	06.11.1974	3,0	160
8	HAB...	21.12.1973	1,1	80
9	HAB...	01.01.1974	1,2	80
10	HAB...	05.02.1974	0,8	80

- TABLEAU XLIX -

TAUX DES ANTISTAPHYLOLYSINES ALPHA ET GAMMA
chez 13 sujets présentant une ostéo-arthrite staphylococcique
non bactériologiquement confirmée
Groupe IV

N°	NOM	DATE	ASTL ALPHA en U. I.	ASTL GAMMA en inverse de dilution
1	LEB...	30.01.1974	<0,7	40
2	LEB...	30.09.1974	1,1	80
3	LEB...	21.10.1974	<0,7	40
4	LEB...	30.10.1974	<0,7	40
5	LEB...	21.11.1974	<0,7	20
6	LEB...	30.01.1975	<0,7	40
7	LEB...	03.04.1975	0,9	40
8	AUB...	13.07.1977	16,8	160
9	AUB...	26.01.1977	16,0	160
10	GIR...	21.01.1974	<0,7	160
11	GIR...	19.01.1977	3,4	80
12	MAS	16.10.1973	5,0	320
13	PIC...	21.01.1974	<0,7	80
14	TEX...	08.12.1975	9,0	2.560
15	TEX...	22.12.1975	3,0	2.560
16	AND...	19.07.1973	21,0	640
17	BON...	11.03.1976	<0,7	80
18	PAS...	26.10.1976	17,6	640
19	CUR...	15.10.1976	<0,7	40
20	LAC...	13.10.1976	3,35	80
21	BAU...	25.03.1977	18,5	320
22	BER...	25.03.1977	1,0	160

20 sujets, soit 69,5 %, ont présenté un taux d'anticorps anti-alpha-hémolysine élevé, et 9 sujets sont restés négatifs, soit 31 %.

De l'examen de l'ensemble des résultats, il ressort que sur les 29 sujets du premier groupe (ostéo-arthrite staphylococcique bactériologiquement confirmée), 24 sujets, soit 82,7 %, ont au moins un des taux d'anti-hémolysine alpha ou gamma élevé, tandis que 2 sujets, c'est-à-dire 6,89 %, ont les deux tests négatifs. 3 sujets, soit 10 %, ont un des deux tests "limité".

Les 24 sujets ayant une sérologie positive se présentent ainsi :

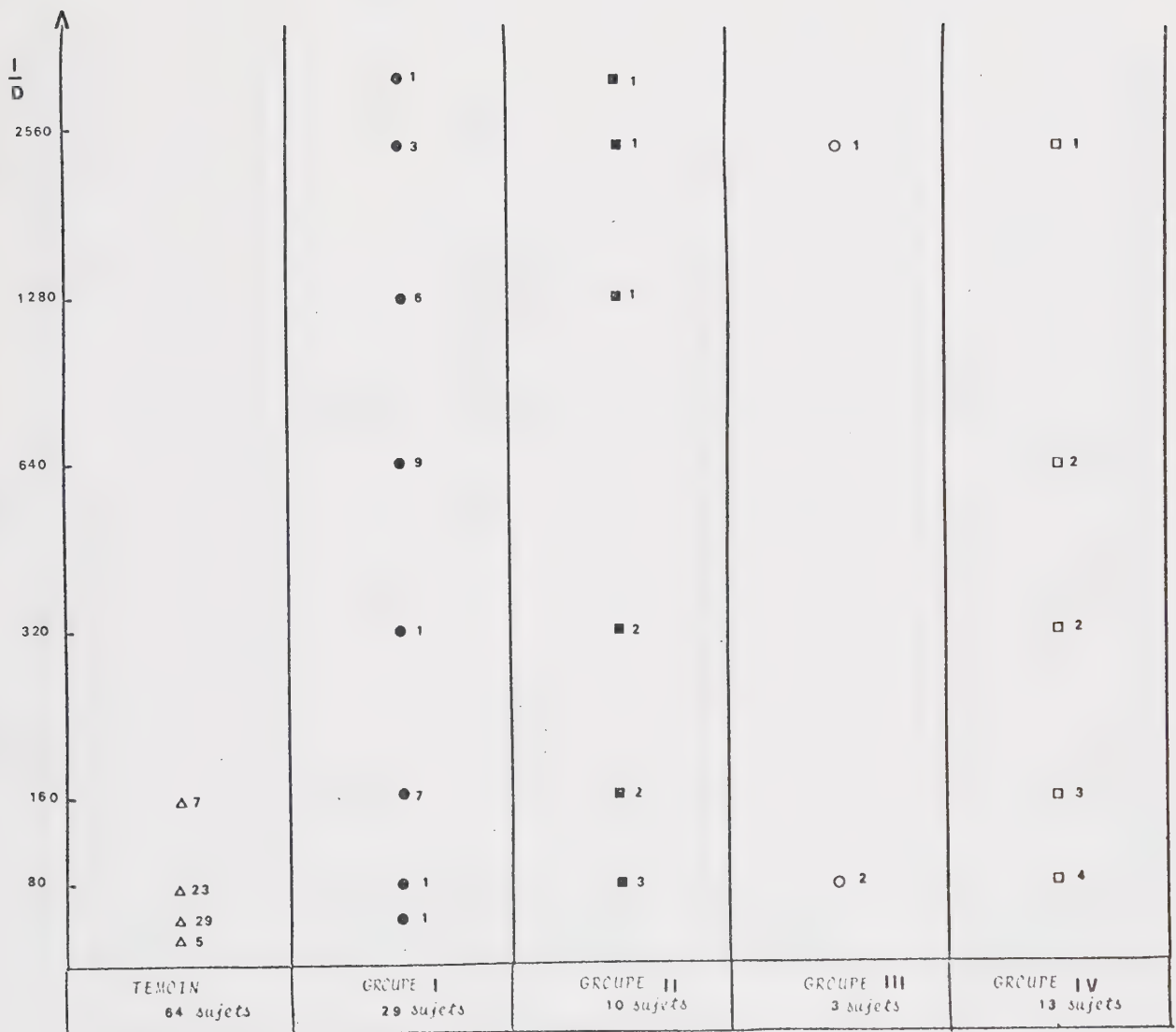
16 sujets présentent une élévation du taux d'anti-alpha et anti-gamma-hémolysine,

4 sujets présentent uniquement une élévation en anti-gamma-hémolysine,

et 4 autres uniquement en anti-alpha-hémolysine.

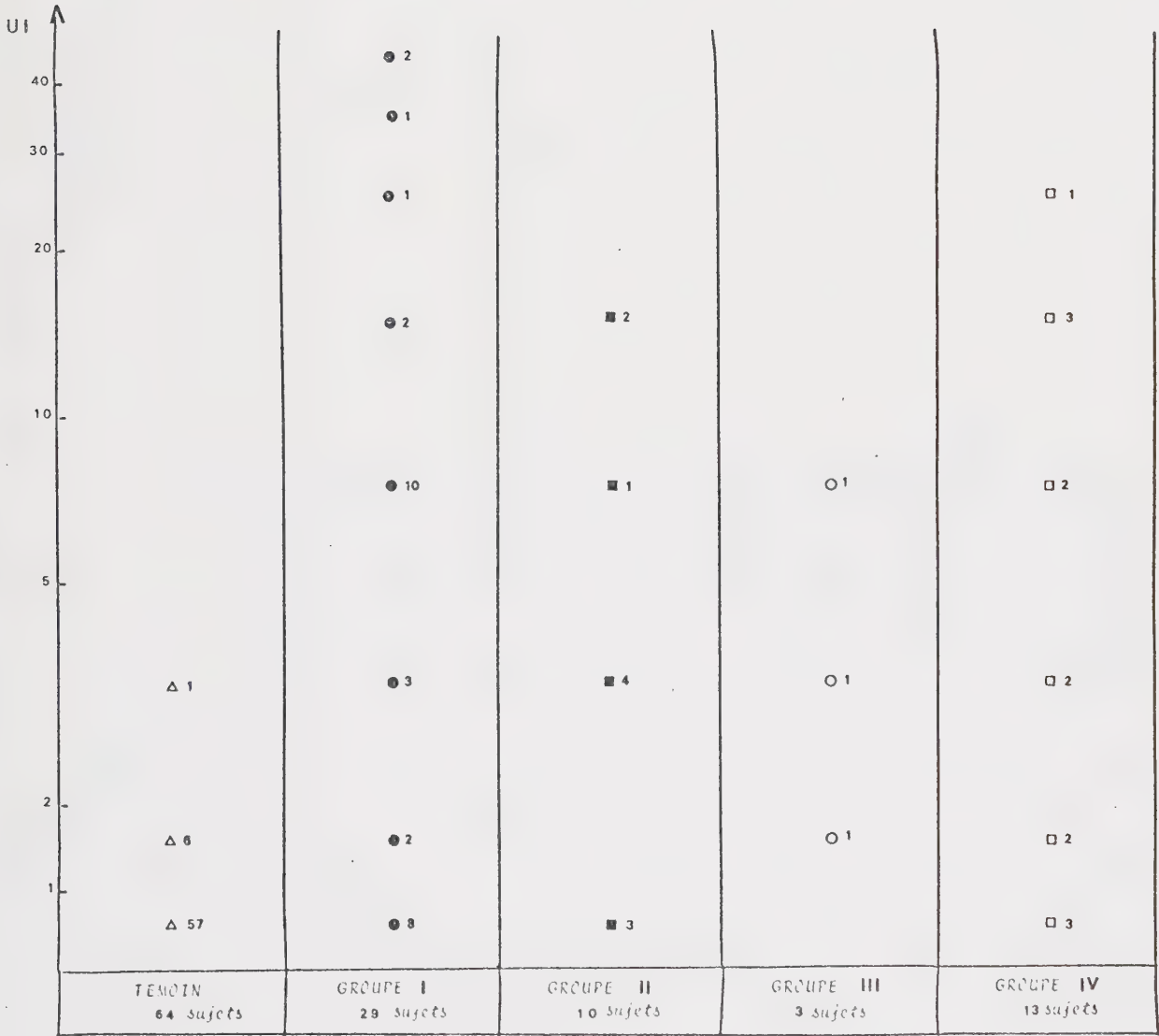
Le titrage simultané des anticorps anti-gamma et anti-alpha-hémolysine fait donc passer la positivité de la sérologie staphylococcique de 69 à 82 %.

- Dans le groupe II comportant 10 sujets ayant une ostéo-arthrite non bactériologiquement confirmée, le titrage de l'anti-gamma-hémolysine confirme la positivité de l'anti-alpha-hémolysine chez 5 sujets et la négativité chez 3 autres.



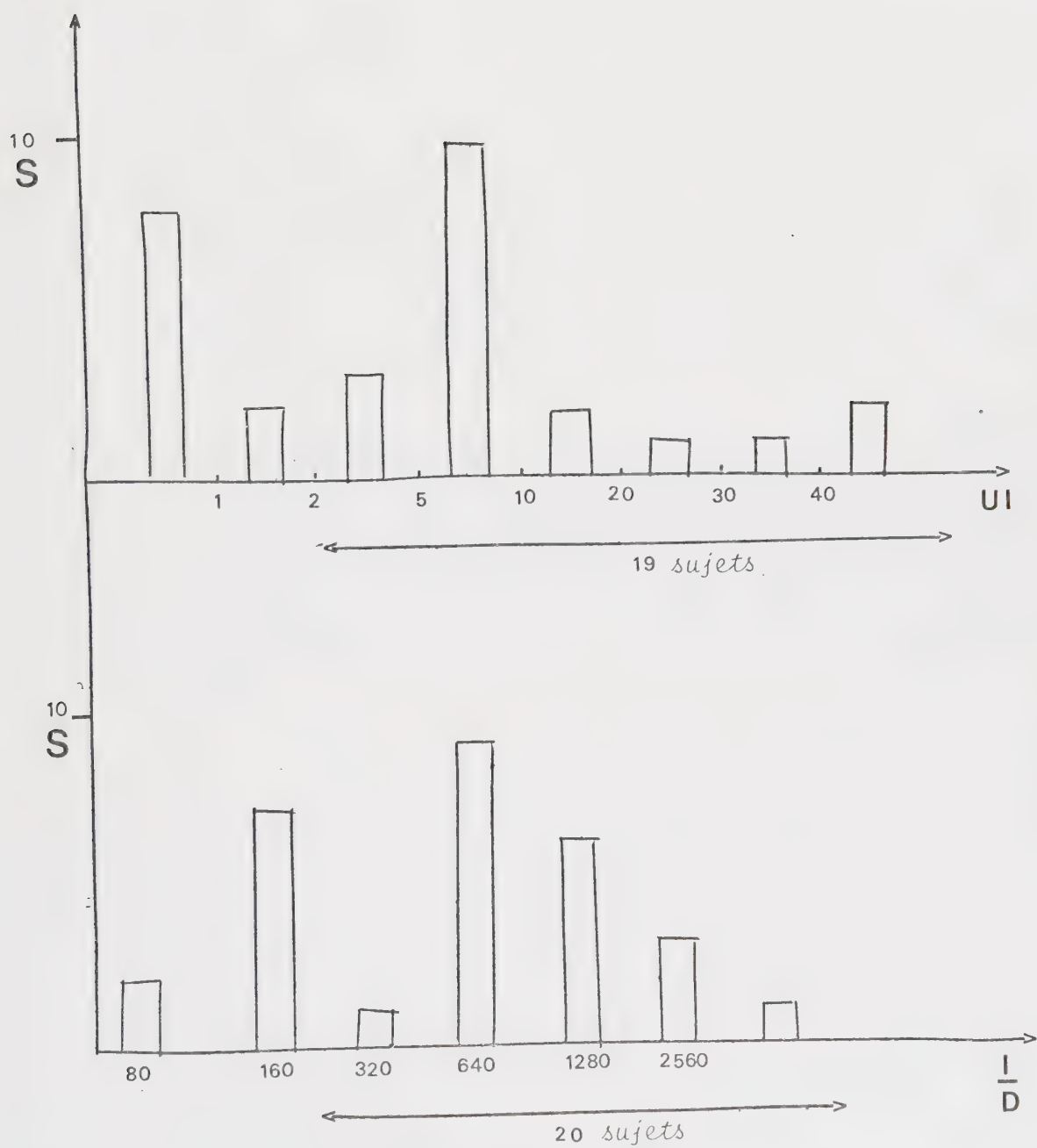
- Figure 10 -

Echelle des titres en anti-gamma-hémolysine
chez les témoins et les sujets des 4 groupes étudiés (titre maximum)



- Figure 11 -

Echelle des titres en anti- α -hémolysine
chez les témoins et les sujets des 4 groupes étudiés (titre maximum)



- Figure 12 -

Distribution des titres d'anti-gamma et anti-alpha hémolysine dans le sérum des sujets du groupe I

Un malade testé 7 fois sur une période de 5 mois, avec un taux d'anti-alpha-hémolysine toujours franchement négatif, présente un taux de 160 en anti-gamma-hémolysine pendant toute cette période.

- Dans le groupe III constitué par des ostéo-arthrites infectieuses non staphylococciques bactériologiquement confirmées, qui ne comporte que 3 sujets, le cas d'ALL... paraît être un exemple remarquable de l'intérêt du dosage de l'anti-gamma-hémolysine qui reste élevée pendant une longue période de normalisation du taux de l'anti-alpha-hémolysine et apporte une explication à la soudaine réélévation des anticorps anti-alpha-hémolysine plus d'un an après.

- Le groupe IV constitue un groupe "témoin" où la staphylococcie est bactériologiquement confirmée, mais dans des localisations autres qu'ostéo-articulaires. Les résultats obtenus dans ce groupe suggèrent que la recherche des anticorps anti-gamma-hémolysine est moins significative que celle des anticorps anti-alpha-hémolysine.

C O N C L U S I O N :

Cette étude préliminaire du taux des anticorps anti-gamma-hémolysine staphylococcique dans les ostéo-arthrites infectieuses est en accord avec les travaux de TAYLOR. Comme TAYLOR, nous avons retrouvé une positivité de ces anticorps dans les ostéo-arthrites staphylococciques bactériologiquement confirmées dans un pourcentage important de sujets : 69,5 % dans notre expérimentation personnelle (63 %, TAYLOR). Mais, par contre, dans notre étude, la combinaison de la recherche des anticorps anti-gamma et anti-alpha-hémolysine a considérablement amélioré la positivité : 79,5 %.

C O N C L U S I O N S

- Un essai de production de Gamma-hémolysine staphylococcique a été pratiqué.

Les exigences techniques nécessaires à l'obtention d'une production valable : entretien de la souche - subculture, richesse du milieu, aération et pH de la culture ont été confirmées. Cependant, un milieu EGY simplifié, où l'extrait de levure en poudre est substitué au dialysat d'extrait de levure, permet une production satisfaisante (200 unités/ml). La purification par absorption sur l'hydroxylapatite permet l'obtention d'une toxine concentrée de bonne spécificité et de titre élevé (400 unités/ml) avec un rendement suffisant.

- L'unité de Gamma-hémolysine utilisée dans ce travail est celle définie par GUYONNET et PLOMMET. Le rôle primordial des différents facteurs : hématies, température, force ionique, osmolarité, dans la détermination de la valeur de l'unité est confirmé et les conditions de la réaction sont établies pour permettre une étude comparative des résultats.

- Une étude des anticorps anti-staphylolysine Gamma a été ensuite conduite selon la technique de PLOMMET. Les modalités de ce dosage ont été étudiées et la spécificité de la réaction Gamma-hémolysine - anticorps vérifiée.

- Une ostéo-arthrite expérimentale staphylococcique conduite chez 30 lapins a déterminé une réponse en antistaphylolysine Gamma rapide et importante. Cette réponse, comparée à celle des anticorps antistaphylolysine Alpha, est plus précoce et plus significative.

- Une étude sur une population d'adultes sains confirme qu'il existe une réponse immunitaire antistaphylococcique et qu'elle détermine, à côté d'un taux faible d'antistaphylolysine Alpha, la présence d'un taux faible d'antistaphylolysine Gamma.

A partir de cette donnée, le taux d'anticorps antistaphylolysine Gamma est recherché dans un groupe de sujets présentant une ostéo-arthrite infectieuse et chez quelques sujets ayant une staphylococcie autre qu'ostéo-articulaire. Chez ces mêmes sujets, les anticorps antistaphylolysine Alpha ont été titrés. Cette étude préliminaire met en évidence l'intérêt de la recherche des anticorps antistaphylolysine Gamma dans le diagnostic des staphylococcies ostéo-articulaires.

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE :

VU, LE DIRECTEUR DE L'U.E.R.
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES,

Ch.A. BIZOLLON


M. CAKRAZ
VU ET PERMIS D'IMPRIMER

LYON, LE 9 Juin 1977

LE PRÉSIDENT DE L'UNIVERSITÉ
CLAUDE BERNARD,

D. GERMAIN

S U M M A R Y

Gamma-hemolysin was prepared by the method of BEZARD and PLOMMET using *Staphylococcus aureus* strain Smith 5R. This study has shown that growth and production of gamma-hemolysin are affected by medium composition, pH, CO₂ tension. Maximum titre is reached after 16 hours incubation, at the late of the exponential phase of growth. The method of purification by hydroxylapatite has yielded a purified gamma 178 U.H./mg protein with 20 % recovery.

A study in rabbit has shown that an experimental staphylococcal osteo-arthritis is related with increased antibodies anti-gamma-hemolysin levels. This increase is early and strong compared with antibodies anti-alpha-hemolysin. An human investigation is reported suggesting the signification of the combined anti-gamma- and anti-alpha-hemolysin test in the diagnosis of osteo-articular infection : in 79 % investigated patients with bacteriologically proven staphylococcal infection, elevated serum anti-gamma and anti-alpha hemolysin titres are found.

B I B L I O G R A P H I E

1. ABRAMSON C. - Staphylococcal Isozymes related to disease
- Zbl. Bakt. Parasit. K. I abt. Supp. 5, 1975, 1041-1054
2. ALI M., HAQUE R. - Identification of staphylococcal epsilon hemolysin.
- Canad. J. Microbiol. 1972, 18, 535-536
3. ALIAND M., RIAZ U., HAQUE R. - Identification of staphylococcal epsilon hemolysin.
- Canad. J. Microbiol. 1972, 18, 535-536
4. ARBUTHNOTT J. -
- Microbiol Toxins 1970, vol. 3, chp. 5, Academic Press N.Y.
5. ARBUTHNOTT J., FREER J., BERNHEIMER A. - Physical states of staphylococcal alpha Toxin.
- J. Bact. 1967, 94, 1170-1172
6. ARBUTHNOTT J., FREER J., BRONWEN BITLCLIFFE - Lipid induces polymerization of staphylococcal alpha Toxin.
- J. Gen. Microbiol 1973, 75, 309-319
7. ARVIDSON S., HOLME T., WADSTROM T. - Influence of cultivation conditions on the production of extracellular proteins by *Staphylococcus aureus*.
- Acta. Path. Microbiol. Scand. 1971, 79, 399-405
8. ARVIDSON S., HOLME T. - Influence of Ph on the formation of extracellular proteins by *Staphylococcus aureus*.
- Acta. Path. Microbiol. Scand. 1971, 79, 406-413.
9. ARVIDSON S., HOLME T., LINDHOLM B. - The formation of extracellular Proteolytic enzymes by *Staphylococcus aureus*.
- Acta. Path. Microbiol. Scand. 1972, 80, 835-844
10. AUDIBERT F., CHEDID L. - Distinctive adjuvancity of synthetic analogs of Mycobacterial water soluble components
- Cell. Imm. 1976, 21, 243-249
11. BARJON P. - Etude des réponses sérologiques au cours des osteo-arthrites expérimentales staphylococciques du lapin
- Thèse Doctorat Médecine Lyon 1975.
12. BARTELL P., ORR T., GEFEEN A. - Expérimental infection of mice with *Staphylococcus aureus*.
- J. Infect. Dis. 1968, 118, 481-490

13. BERNHEIMER A. - Intereactions between membranes and cytolytic bacterial Toxins.
- Biochim. Biophys. Acta. 1974, 344, 27-50
14. BERNHEIMER A., SCHWARTZ L. - Isolation and composition of Staphylococcal alpha Toxin.
- J. Gen. Microbiol. 1963, 30, 455-468
15. BERNHEIMER A., SCHWARTZ L. - Effects of staphylococcal and other bacterial toxins on platelet in vitro.
- J. Path. Bact. 1965, 89, 209-223
16. BERNHEIMER A., KIM K., REMSEM C. - Factors affecting intereaction of staphylococcal alpha toxin with membranes
- Infect. Immun. 1972, 6, 636-642
17. BERNHEIMER A., AVIGAD L., KIM K. - Staphylococcal Sphingomyelase (B hemolysin)
- Ann. N. Y. Acad. Sci. 1974, 236, 292-306
18. BEZARD G. et PLOMMET M. - Production de la toxine Staphylococcique Gamma brute.
- Ann. Rech. Vet. 1973, 4, 355-358
19. BHASKARAN C., JAYAKAR P. - Biochemical activity of coagulase positive staphylococci isolated from cases and carriers
- Path. Microbiol. 1969, 33, 39-43
20. BLAIR J.E., CARR. M. - staphylococci in lysogeny
- J. Bact. 1961, 82, 984-993
21. BONVENTRE P.
- Microbiol. Toxins 1970, volume 1, chap. 2
Academic Press N.Y.
22. BUCKELEN A., COLACICCO G. - Lipid monolayers intereactions with staphylococcal alpha Toxin.
- Biochim. Biophys. Acta. 1971, 233, 7-16
23. BURNS J., HOLTMAN D. - Biochemical properties of virulent and avirulent staphylococci
- Ann. N.Y. Acad. Sc. 1960, 88, 1115-1124
24. BURNET F. - The exotoxins of st. pyogenes aureus
- J. Path. Bact. 1929, 32, 717-734
25. BURNET F. - The production of staphylococcal toxin
- J. Path. Bact. 1930, 33, 1-16
26. CAIRD J., WISEMAN G. - Purification of the delta toxin of staphylococcus aureus.
- Canad. J. Microbiol. 1970, 16, 703-708

27. CASSIDY P., HARSHMAN S. - The binding of staphylococcal 125_I alpha toxin (B) to erythrocytes
- J. Biol. Chem. 1973, 248, 5545-5546
28. CASSIDY P., SIX H., HARSHMAN S. - Biological properties of staphylococcal alpha toxin
Biochim. Biophys. Acta 1974, 332, 413-423
29. CASSIDY P., HARSHMAN S. - Staphylococcal alpha toxin : properties of the Iodotoxin derivative and its binding to erythrocytes
- Zbl. Bakt. Parasit. K. I abt. Supp. 5 1975, 707-720
30. CHEDID L., AUDIBERT F., LEFRANCIER P. - Modulation of the immune response by a synthetic adjuvant and analogs
- Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 1976, 73, 2472-2475
31. CHESBRO W., HEYDRICK F., MARTINEAU R. - Purification of staphylococcal beta hemolysin and its action on staphylococcal and streptococcal cell walls
J. Bact. 1965, 89, 378-389
32. CLECNER B., SONEA S. - Acquisition de la propriété hemolytique de type delta par conversion lysogénique chez *Staphylococcus aureus*.
- Rev. Canad. Biol. 1966, 25, 145-148
33. COOPER L., MADOFF M., WEINSTEIN L. - Heat stability and species range of purified staphylococcal alpha toxin.
- J. Bact. 1966, 91, 1686-1692
34. COULTER J. - Production, purification and composition of staphylococcal alpha toxin.
- J. Bact. 1966, 92, 1655-1662
35. COULTER J., MUKHERJEE T. - Electron microscopy localization of alpha toxin within the staphylococcal cell by ferritin labeled antibody.
- Infect. Immun. 1971, 4, 650-655
36. DALEN A. - Production of staphylococcal alpha toxin in a defined medium and indentification of a stimulating factor from yeast extract.
- J. Gen. Microbiol. 1973, 74, 53-60
37. DALEN A. - The induction of staphylococcal alpha toxin by histidine.
- J. Gen. Microbiol. 1973, 74, 61-69
38. DALEN A. - The influence of Ph and histidine dipeptides on the production of staphylococcal alpha toxin.
- J. Gen. Microbiol. 1973, 79, 265-274
39. DALEN A. - Molecular forms of staphylococcal alpha toxin
- Zbl. Bakt. Parasit. K. I abt. Supp. 5 1975, 721-723

40. DAUGHARTY H., RUSSEL M., WHITE A. - Antibodies against staphylococcal teichoic acids and type specific antigens in man.
- J. Immunol. 1967, 98, 1123-1129
41. DOERY H., MAGNUSSON B., CHEYNE I. - A phospholipase in staphylococcal toxin which hydrolyzes sphingomyelin
- Nature Lond. 1963, 198, 1091-1092
42. DONAHUE J., DOLMAN C., WILSON R. - The kitten test for st. enterotoxin.
- Can. J. Public Health 1940, 31, 68-71
43. DONAHUE J. - Antistaphylococcal hemolysin and delta hemolysin inhibitor in adult human serum
- Canad. J. Microbiol. 1969, 15, 957-959
44. DUNCAN J., CHO G. - Production of staphylococcal alpha toxin I. relationship between cell growth and toxin formation
- Infect. Immun 1971, 6, 456-461
45. DUNCAN J., CHO G. - Production of staphylococcal alpha toxin
- Infect. Immun 1972, 6, 689-694
46. EASMON C., GLYNN A. - The role of humoral immunity and acute inflammation in protection against staphylococcal dermonecrosis.
- Immunology Lond. 1975, 29, 67-74
47. EASMON C., GLYNN A. - Cell mediated immune responses in Staphylococcus aureus infection in mice
- Immunology Lond. 1975, 29, 75-84
48. ELEK S., LEVY E. - Distribution of hemolysis in pathogenic and non pathogenic staphylococci.
- J. Path. Bact. 1950, 62, 541-554
49. FACKRELL H., WISEMAN G. - Immunogenicity of the hemolysin of Staphylococcus aureus.
- J. Med. Microbiol. 1974, 7, 411-414
50. FACKRELL H., WISEMAN G. - Production and purification of the gamma hemolysin of Staphylococcus aureus Smith 5 R.
- J. Gen. Microbiol. 1976, 92, 1-10
51. FACKRELL H., WISEMAN G. - Properties of the gamma hemolysin of Staphylococcus aureus Smith 5 R.
- J. Gen. Microbiol. 1976, 92, 11-24
52. FLEURETTE J., BRUN Y. - Caractères biochimiques et angigéniques de Staphylococcus epidermidis.
- Ann. Inst. Pasteur 1972, 123, 783-797
53. FOSTER W. - The role of alpha haemolysin in the pathogenicity of Staphylococcus aureus.
- J. Path. Bact. 1963, 86, 535-543

54. FOSTER E. - Hemolysin production in the development of staphylococcal lesions
- Science 1965, 149, 1395-1396
55. FORLANI L., BERNHEIMER A., CHIANCONE E. - Ultracentrifugal analysis of staphylococcal alpha toxin.
- J. Bact. 1971, 106, 138-142
56. FREER J., ARBUTHNOTT J., BERNHEIMER A. - Intereaction of staphylococcal alpha toxin with artificial and natural membranes.
J. Bact. 1968, 95, 1153-1168
57. FREER J., ARBUTHNOTT J., BRONWEN BILLCLIFFE - Effects of staphylococcal alpha toxin on the structure of erythrocyte membranes : a biochemical and freeze etching study.
- J. Gen. Microbiol. 1973, 75, 321-332
58. FREUND J. - Some aspects of active immunization.
- Ann. Rev. Microbiol. 1947, I, 291-308
59. GALANTI B., PARADISI F., MANCINI A. - An early effect of Staphylococcus aureus alpha toxin on cells growing in culture ATP levels in normal and intoxicated cells.
- Path. Microbiol. 1968, 32, 277-284
60. GLADSTONE G. - The production of staphylococcal alpha haemolysin in a chemically defined medium.
- Br. J. Exp. Path. 1938, 19, 208-226
61. GLADSTONE G. - Staphylococcal haemolysins.
- Postepy Mikrobiol. 1966, 5, 145-160
62. GLADSTONE G., FILDES P. - A sample culture medium for general use without meat extract or peptone.
- Br. J. Exp. Path. 1940, 4, 161-166
63. GLADSTONE G., VAN HEYNINGEN W. - Staphylococcal leucocidine
- Br. J. Exp. Path. 1960, 41, 123-137
64. GLADSTONE G., YOSLUDA A. - The cytopathic action of purified staphylococcal delta hemolysin.
- Br. J. Exp. Path. 1967, 48, 11-19
65. GLENNY A., STEVENS N. - Staphylococcus toxins and antitoxins
- J. Path. Bact. 1935, 40, 201-210
66. GOODE R., BALDWIN J. - Purification of staphylococcal alpha toxin by electrofocusing.
- Prep. Biochem. 1973, 3, 349-361
67. GOODE R., BALDWIN J. - Comparison of purified alpha toxin from various strains of Staphylococcus aureus.
- Appl. Microbiol. 1974, 28, 86-90

68. GOW J., ROBINSON J. - Properties of purifical staphylococcal B hemolysin.
- J. Bact. 1969, 97, 1026-1032.
69. GRIGOROVA M., BAIJOSOV D. - Enzyme activity and Phage sensitivity of Staphylococcus epidermidis.
- Zbl. Bakt. Parasit. K. I abt. Supp. 5 1975, 175-177
70. GUYONNET F., PLOMMET M., BOUILLANNE C. - Purification de l'hémolysine gamma de Staphylococcus aureus.
- C.R. Acad. Sci. 1968, 267, 1180-1182
71. GUYONNET F., PLOMMET M. - Hémolysine gamma de Staphylococcus aureus. Purification et propriétés.
- Ann. Inst. Pasteur 1970, 118, 19-33.
72. HALLANDER J. - Characterization and partial purification of staphylococcal delta lysin.
- Acta. Path. Microbiol. Scand. 1968, 72, 586-600
73. HALLANDER H., LAURELL G., LOFSTROM G. - Stimulation of staphylococcal haemolysin production by low concentrations of penicillin.
- Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 1966, 68, 142-148
74. HALLANDER H., BENGTSSON S. - Studies on the cell toxicity and species specificity of purified staphylococcal toxins.
- Acta. Path. Microbiol. Scand. 1967, 70, 107-119
75. HAQUE R., BALDWIN J. - Purification and properties of staphylococcal B haemolysin I production of B hemolysin
- J. Bact. 1964, 88, 1304-1309.
76. HAQUE R. BALDWIN J. - Purification and properties of staphylococcal hemolysin : II purification of B hemolysin.
- J. Bact. 1969, 100, 751-759.
77. HEATLEY N. - A new method for the preparation and some properties of staphylococcal delta hemolysin.
- J. Gen. Microbiol. 1971, 69, 269-278.
78. HEDSTROM S., KAMME C. - Antibodies against staphylococcal bacteriophage in human sera.
- Acta. Path. Microbiol. Scand. 1973, 81, 741-748 et 749-752.
79. HEYDRICK F., CHESBRO W. - Purification and properties of staphylococcal B toxin.
- Bacterial. Proc. 1962, cité par Wiseman.

80. HOFFMANN E., STREITFELD M. - The antibiotic activity associated with preparations of delta hemolysin of *Staphylococcus aureus*.
- *Canad. J. Microbiol.* 1965, 11, 203-211.
81. HOLME T., WADSTROM T. - A continuous process for the production of extracellular proteins by *Staphylococcus aureus*.
- *Acta. Path. Microbiol. Scand.* 1971, 79, 414-420.
82. JACKSON A. - Staphylococcal gamma lysin and its differentiation from delta lysin.
- *Recent Progress in Microbiology : Symposia 1963*, Gibbons Ed. University of Toronto Press.
83. JACKSON A., LITTLE R. - Leucocidal effect of staphylococcal delta lysin.
- *Canad. J. Microbiol.* 1957, 3, 101-102
84. JACKSON A., LITTLE R. - Staphylococcal toxins, factors affecting hemolysin by delta lysin.
- *Canad. J. Microbiol.* 1958, 4, 435-444.
85. JACKSON A. and LITTLE R. - Staphylococcal toxins. Partial purification and some properties of delta lysin.
- *Canad. J. Microbiol.* 1958, 4, 453-461
86. JACKSON A., MAYMAN D. - Staphylococcal toxins. Factors effecting hemolysis by delta lysin.
- *Canad. J. Microbiol.* 1958, 4, 477-486.
87. JOHNSON J., CLUFF L., GOSHI K. - Studies on the pathogenesis of staphylococcal infection.
- *J. Exp. Med.* 1961, 113-235.
88. KAMME C. - Antibodies against staphylococcal bacteriophages in human sero.
- *Acta. Path. Microbiol. Scand.* 1973, 81, 741-748.
89. KANTOR H., TEMPLES B., SHAW W. - Delta *Staphylococcus hemolysin* : purification and characterization.
- *Arch. Bio. Chem. Biophys.* 1972, 151, 142-156.
90. KAPLAN M. - Specific and nonspecific staining in detecting staphylococcal alpha toxin on erythrocytes by immunofluorescence.
- *Infect. Immun.* 1972, 5, 831-832.
91. KAPRAL F. - The phagocytosis and intra cellular fate of staphylococci.
- *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1965, 128, 288-300.

92. KAPRAL F. - Inhibition of *Staphylococcus aureus* delta hemolysin by phospholipids.
- Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1972, 141, 519-521.
93. KAPRAL F. - *Staphylococcus aureus* : same host parasite entereactions.
- Ann. N.Y. Acad. Sci. 236, 1974, 267-276.
94. KAPRAL F. - Effect of fatty acids on *Staphylococcus aureus* delta toxin hemolytic activity.
- Infect. Imm. 1976, 13, 114-119
95. KAPRAL F., MILLER M. - Product of *Staphylococcus aureus* responsable of the scaled skin syndroms.
- Infect. Imm. 1971, 4, 541-545.
96. KAPRAL F., O'BRIEN A., RUFF P. - Inhibition of water absorption in the intestine by *staphylococcus aureus* delta toxin.
- Infect. Imm. 1976, 13, 140-145.
97. KATO I., NAIKI M. -
- Infect. Imm. 13, 289, cité par MARCUS et SCHWARTING dans advances in Immunology 1976, 23.
98. KAYSER A., RAYNAUD M. - Etude d'une deuxième hemolysine distincte de l'hémolysine alpha présente dans les filtrats de culture de la souche Wood 46 de *Staphylococcus aureus*.
- Ann. Inst. Pasteur 1964, 108, 215-233.
99. KLAINER A., MADOFF A., COOPER L. - Staphylococcal alpha haemolysin detection on the erythrocyte membran by fluorescence
- Sci. 1964, 145, 714-715.
100. KLECK J., DONAHUE J. - Production of thermolable hemolysin by cultures of *Staphylococcus epidermidis*.
- J. Infect. Dis. 1968, 181, 317-323.
101. KORBECKI M., JELJASZEWICZ - Action of staphylococcal toxins in cell cultures.
- J. Infect. Dis. 1965, 115, 205-213.
102. KREGER A., KIM F., ZABORETSKY F. - Purification and properties of staphylococcal delta hemolysin.
- Infect. Imm. 1971, 3, 449-465.
103. KREGER A., BERNHEIMER A. - Description of bacterial protoplasts and spheroplasts by staphylococcal delta hemolysin.
- Infect. Imm. 1971, 3, 609-605.
104. KUREK M., PRYJMA K., BARTKOWSKI S. - Ann. Staphylococcal gamma hemolysin antibodies in rabbits with staphylococcal osteomyelitis.
- Med. Microbiol. Immun. 1977, 163, 61-65.

105. LACEY R., RICHMOND M., The genetic basis of antibiotic resistance in *Staphylococcus aureus* : the importance of gen transfer in the evolution of this organism in the hospital environment.
- Ann. N.Y. Acad. Sci. 1974, 236, 395-412
106. LACK C. - Staphylococcal antibody in osteomyelitis and suppurative arthritis.
- Proc. Roy. Soc. Med. 1957, 50, 625-628
107. LACK C., WAILLING G. - A study of 453 strains of *Staphylococcus pyogenes* with reference to factors which may contribute to pathogenicity.
- J. Path. Bact. 1954, 68, 431-443.
108. LOMINSKI I., ARBUTHNOTT J., SCOTT A. - Effect of staphylococcal alpha toxin on striated muscle of mice.
- Lancet 1962, II, 590.
109. LOMINSKI I., ARBUTHNOTT J., SPENCE J. - Purification of *Staphylococcus alpha* toxin.
- J. Path. Bact. 1963, 86, 258-262.
110. MAC NIVEN A., OWE P. - ARBUTHNOTT J. - Multiple forms of staphylococcal alpha toxin.
- J. Med. Microbiol. 1972, 5, 113-122.
111. MAC NIVEN A., ARBUTHNOTT J. - Cell associated alpha toxin from *Staphylococcus aureus*.
- J. Med. Microbiol. 1972, 5, 123-127.
112. MADOFF M., WEINSTEIN L. - Purification of staphylococcal alpha hemolysin.
- J. Bact. 1962, 82, 914-918.
113. MAHESWARAN S., SMITH K., LINDORFER K. - Staphylococcal B hemolysin I purification of B hemolysin
- J. Bact. 1967, 94, 300-305
114. MANIAR A., WESLAKE C., WARNER P. - Prevalence of staphylococcal anti delta lysin human
- Canad. J. Microbiol. 1967, 13, 926-929
115. MANOHAR M., MAHESWARAN S., FROMMES S. - Platelet damaging factor, a fifth activity of staphylococcal alpha toxin.
- J. Bact. 1967, 94, 224-231
116. MARGUS D., SCHWARTING G. - Glycolipids and phospholipids
- Advances in Imm. 1976, 23,
117. MARKS J. - The standardization of staphylococcal alpha antitoxin with special reference to anomalous hemolysins including delta hemolysin.
- J. Hyg. 1951, 49, 52-56

118. MARKS J., WAUGHAN A. - Staphylococcal delta hemolysin.
- J. Path. Bact. 1950, 62, 597-615
119. MEDUSKI J., HOCHSTEIN P. - Hot cold hemolysin the role of positively charged membrane phospholipids.
- Experientia 1972, 15, 565-566
120. MOLLBY R. - Effects of staphylococcal B hemolysin (sphingomyelinase C) on cell membranes.
- Zbl. Bakt. Parasit. K. I abt. Supp. 5 1975, 665-677
121. MOLLBY R., WADSTROM T. - Protids in biological fluids
- Pergamon Press Oxford 1970, 465-469.
122. MOLLBY R., WADSTROM T. - Separation of gamma hemolysin from *Staphylococcus aureus* smith R 5.
- Infect. Imm. 1971, 3, 633-635
123. MOORE G., KOCHOLATY W., COOPER D. - A proteinase from human erythrocyte membranes.
- Biochim. Biophys. Acta 1970, 212, 126-133
124. NOBLE W. - Virulence and the biochemical characters of staphylococci.
- J. Path. Bact. 1966, 91, 181-193.
125. NOGRADY G., BURTON A. - Effet de la toxine staphylococcique alpha sur les cellules d'embryon de poulet en cultures de tissus.
- Path. Biol. 1964, 9, 831-833.
126. NOWICK R. - Extrachromosomal nature of drug resistance in *Staphylococcus aureus*.
- Ann. N.Y. Acad. Sci. 1971, 182, 279-294.
127. OTTAWIANI C. - Antitossina stafilococcica nel siero di pazienti osteomielitici rivelata coll' analisi immuno elettroforetica.
- Bull. Soc. Ital. Biol. Sero. 1965, 39, 542-543.
128. PARADISI F., BARSOTTI P., CIFARELLI A. - The mode of action of staphylococcal alpha toxine on cell cultures an electron microscope study.
- Zbl. Bakt. Parasit. K. I. abt. Supp. 5, 1975.
129. PERRIER J. - Apport du dosage des antistaphylolysines au diagnostic des staphylococcies osteo-articulaires.
- Thèse Medecine Lyon 1971.

130. PIOTROWSKA E., JOZEFCSYK Z. - Toxin forming potency of chemical strains of *Staphylococcus aureus*.
- Zbl. Bakt. Parasit. K. I. abt. Supp. 5, 1975. 577-582
131. PLOMMET M., BOUILLANNE C. - Production des hémolysines staphylococciques delta et gamma.
- Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys. 1966, 6, 529-532
132. QUENEAU P., LEJEUNE E., BERTOYE A. - Intérêt du dosage des antistaphylolysines en pathologie osteo-articulaire.
- Lyon Médical 1972, 228, 345-350.
133. QUENEAU P., BARJON P., PERRIER J. - Etude des antistaphylolysines sériques au cours des arthrites et ostéites staphylococciques expérimentales du lapin.
- INSERM, Colloque de synthèse 1975, Série Action thématique. Rapport n° 6, 179-195.
134. QUENEAU P., LEJEUNE E., BERTOYE A. - Intérêt du dosage des antistaphylolysines sériques dans le diagnostic des staphylococcies ostéoarticulaires.
- Rhumatologie 1975, 27, 47-54.
135. QUENEAU P., LEJEUNE E., BERTOYE A. - Valeur du dosage des anti-alphastaphylolysines sériques pour le diagnostic des staphylococcies ostéo-articulaires.
- Lyon Médical 1976, 235, 203-205.
136. RAHAL J. - Comparative effects of purified staphylococcal gamma et delta toxins on mitochondrial metabolism.
- J. Infect. Dis. 1972, 125, 96-103.
137. RAHAL J., PLAUT H., ROSEN H. - Purified staphylococcal alpha toxin effect on epithelial ion transport.
- Science 1967, 155, 1118-1120.
138. RAMON G., RICHOU R., DJOURICHITCH M. - Sur le mécanisme de l'immunité conférée par l'anatoxine staphylococcique à l'égard de l'infection par le Staphylocoque virulent.
- Rev. Immunol. 1936, 482-493.
139. RAMON G., BOCAGE A., RICHOU R. - Etude sérologique et clinique de l'immunité dans l'anatoxithérapie staphylococcique.
- Rev. Immunol. 1936, 2, 551-565.
140. RAMON G., GERNEZ, CH., RICHOU R. - Recherches sur le développement de l'immunité antitoxique et sur les conditions optima de l'immunisation dans l'anatoxithérapie staphylococcique chez l'homme.
- Rev. Immunol. 1936., 2, 566, 579.

141. RICHOU R., HOLSTEIN G. - Developpement de l'antitoxine staphylococcique chez les animaux soumis aux injections d'anatoxine spécifique.
- Rev. Immunol. 1940, 1941, 363.
142. ROBINSON J., THATCHER F., GAGNON J. - Studies with staphylococcal toxins: IV the purification and metallic requirements of specific hemolysins.
- Canad. J. Microbiol. 1958, 4, 345-361
143. ROBINSON J., THATCHER F. - Studies with staphylococcal toxins: VII separation of a proteolytic enzyme from alpha hemolysin.
- Canad. J. Microbiol. 1963, 9, 697-702.
144. ROGOUSKY M., WARREN R., WILEY B. - Nature of the genetic determinant controlling exfoliative toxin production in *Staphylococcus aureus*.
- J. Bact. 1974, 117, 157-165.
145. RUBI G. - Valeur sémiologique du dosage des anticorps antienzymes, staphylococciques et pneumococciques.
- Thèse Médecine Lyon 1968.
146. SHARMA B., HAQUE R. - Effect of tryptophan analogues on synthesis of staphylococcal B hemolysin.
- J. Gen. Microbiol. 1973, 77, 221-224.
147. SIX H., HARSHMAN S. - Purification and properties of 2 forms of staphylococcal alpha toxin.
- Biochemistry 1973, 12, 2672-2676.
148. SIX H. - HARSHMAN S. - Physical and chemical studies on staphylococcal alpha toxins A and B.
- Biochemistry 1973, 12, 2677-2682.
149. SMITH M., PRICE S. - *Staphylococcus* Beta hemolysin.
- J. Path. Bact. 1938, 47, 361-377.
150. SMITH M., PRICE S. - *Staphylococcus* gamma hemolysin.
- J. Path. Bact. 1938, 47, 379-392.
151. SMITH H., HALLS S. - The transmissible nature of the genetic factor in *E. Coli* that controls hemolysin production.
- J. Gen. Microbiol. 1967, 47, 153-158.
152. SMITH H., HALLS S. - The transmissible nature of genetic factor in *E. Coli* that controls enterotoxins production.
- J. Gen. Microbiol. 1968, 52, 319-326.
153. SPETH V., WALLACH D., WEIDEKAMM E. - Micromorphologic consequences following pertubation of erythrocytes membranes by trypsine, phospholipase A lysolecithin sodium dedecyl sulphate and saponin A correlated freeze etching and biochemical study.
Biochim. Biophys. Acta. 1972, 255, 386-394.

154. SYMINGTON D., ARBUTHNOTT J. - Effects of Staphylococcus alpha toxin and streptolysins on the oxidation of succinate by ascites tumour cells.
- J. Med. Microbiol. 1969, 2, 495-505.
155. SZMIGIELSKI S., JELJASZEWICK M., KOBUS M. - Cytotoxic effects of staphylococcal alpha beta gamma hemolysins
- Zbl. Bakt. Parasit. K. I. abt. Supp. 5 1975, 691-705.
156. TAUBLER J. - Staphylococcal delayed hypersensitivity in mice (induction and in vivo).
- J. Immunol. 1968, 101, 546-549.
157. TAUBLER J., MUDD S. - Staphylococcal delayed hypersensitivity in mice. "In vitro demonstration and specificity of delayed hypersensitivity."
- J. Immunol. 1968, 101, 550-555.
158. TAYLOR A., FINCHAM W., COOK J. - Staphylococcal antibodies in osteomyelitis: the use of antistaphylococcal nuclease levels in diagnosis.
- Zbl. Bakt. Parasit. K. I abt. supp. 5 1975, 911-916.
159. TAYLOR A., PLOMMET M. - Anti gamma haemolysin as a diagnostic test in staphylococcal osteomyelitis.
- J. Clin. Path. 1973, 26, 409-412.
160. TAYLOR A., BERNHEIMER A. - Further characterizaion of staphylococcal gamma hemolysin.
- Infect. Immun. 1974, 10, 54-59.
161. TAYLOR A., COOK J., FINCHAM W. - Serological tests in the differentiation of staphylococcal and tuberculous bone disease.
- J. Clin. Path. 1975, 28, 284-288.
162. THELESTAM M. - Effects of Staphylococcus aureus haemolysins on the plasma membrane of cultured mammalian cells.
- Zbl. Bakt. Parasit. K. I abt. Supp. 5 1975. 679-690
163. THELESTAM M., MOLLBY R., WADSTROM T. - Effects of staphylococcal alpha beta delta gamma hemolysine on human deploids fibrobasts and hela cells.
- Infect. Immun. 1973, 8, 938-946.
164. TIRUNARAYANAN M., LANDBLAD G. - Investigations on the enzymes and toxins of staphylococci.
- Acta. Path. Microbiol. Scand. 1966, 68, 135-141.
165. TIRUNARAYANAM M., LUNDBECK H. - Investigations on the enzymes and toxins of staphylococci. Stimulation of coagulase isosynthesis by glucose and bicarbonate.
- Acta. Path. Microbiol. Scand. 1966, 68, 273-280



166. TIRUMARAYANAN M., LUNDBECK H. - Investigations on the enzymes and toxins of staphylococci.
- Acta Path. Microbiol. Scand. 1968, 74, 274-286
167. TIRUNARAYANAN M., LUNDBLAD G., LUNDBECK G. - Investigations on the enzymes and toxins of staphylococci.
- Acta Path. Microbiol. Scand. 1969, 75, 111-124
168. UYEDA C., GERSTL B., SMITH J. - Antistaphylococcal beta hemolysin antibodies in humans with neurological disease.
- Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1966, 123, 143-146
169. VYMOLA F., BUDA J. - Chronic staphylococcal infections.
Zbl. Bakt. Parasit. K I abt. Supp 5, 1975: 1089-1091.
170. WADSTROM T. - Studies on extracellular proteins from St. aureus IV Separation of alpha toxin by isoelectric focusing.
Biochim. Biophys. Acta 1968, 168, 228-242.
171. WADSTROM T., MOLLBY R. - Studies on extracellular proteins from St. aureus: VI Production and purification of B hemolysin in large scale.
- Biochim. Biophys. Acta 1971, 242, 288-307.
172. WADSTROM T., MOLLBY R. - Studies on extracellular proteins from St. aureus: VII Studies on B hemolysin.
- Biochim. Biophys. Acta 1971, 200, 308-320.
173. WADSTROM T., THELESTAM M., MOLLBY R. - Biological properties of extracellular proteins from Staphylococcus.
- Ann. H. Y. Acad. Sci. 1974, 236, 343-364.
174. WALBUM L.E. - Action de divers sels métalliques sur la production de Staphylolysin.
- C.R. Soc. Biol. 1921, 85, 376-377.
175. WEISSMAN G., SESSA G., BERNHEIMER A. - Staphylococcal alpha toxin : effects on artificial lipid spherules.
- Science, 1966, 154, 772-774.
176. WHITE W. - Control of gamma hemolysin formation by plasmids in distinct strains of S. aureus : influence of erythromycin Rifampicin and Streptomycin.
- Zbl. Bakt. Parasit. K.I. Abt. Supp. 5, 1975.
177. WILLIAMS R., HARPER G. - Staphylococcal haemolysins on sheep blood agar with evidence for a fourth haemolysin.
- J. Pathol. Bact. 1947, 89, 187-207.

178. WISEMAN G. - Some CHARACTERISTICS of the beta haemolysin of *Staphylococcus aureus*.
- J. Path. Bact. 1965, 89, 187-207.
179. WISEMAN G. - Beta and delta toxins of *S.aureus*.
Microbial Toxins III Chap. 6, 1970.
180. WISEMAN G. - The haemolysins of *Staphylococcus aureus*
- Bact. Rev. 1976, 39, 317-344.
181. WISEMAN G., CAIRD J. - The nature of staphylococcal Beta haemolysin.
- Canad. J. Microbiol. 1967, 13, 369-376.
182. WISEMAN G. - The nature of staphylococcal beta haemolysin.
II Effect on mammalian cells.
- Canad. J. Microbiol. 1968, 14, 179-181.
183. WISEMAN G., CAIRD J. - Phospholipase activity of the delta haemolysin of *S. aureus*.
- Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1968, 128, 428-430.
184. WISEMAN G., CAIRD J. - Mode of action of the alpha toxin of *staphylococcus aureus*.
- Canad. J. Microbiol. 1970, 16, 47-50.
185. WISEMAN G., CAIRD J. - Further observations on the mode of action of the alpha toxin of *staphylococcus* "Wood 46".
- Canad. J. Microbiol. 1972, 18, 987-992.
186. WURZEL M., BERNHEIMER A., ZWEIFACH B. - Staphylococcal alpha toxin: induced contraction of isolated arterial smooth muscle.
- Amer. J. Physiol. 1966, 210-360.
187. YOSHIDA A. - Staphylococcal delta haemolysin.
I. Purification and chemical properties.
- Biochim. Biophys. Acta 1963, 71, 544-553.

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
INTRODUCTION.....	1
<u>Première Partie :</u>	
LES HEMOLYSINES STAPHYLOCOCCIQUES.....	4
1. Les différentes hémolysines staphylococ-	
ciques.....	5
Introduction.....	6
1.1. L'alpha-hémolysine.....	8
1.2. La bêta-hémolysine.....	24
1.3. La delta-hémolysine.....	36
1.4. La gamma-hémolysine.....	44
1.5. L'epsilon-hémolysine.....	55
1.6. Tableaux récapitulatifs.....	56
2. Rôle des hémolysines dans le pouvoir patho-	
gène du staphylocoque.....	60
3. La réponse immunitaire vis-à-vis des	
hémolysines staphylococciques.....	66
<u>Deuxième Partie :</u>	
TRAVAUX PERSONNELS.....	73
1. Préparation et purification de la gamma-	
hémolysine staphylococcique.....	74
1.1. Introduction.....	75
1.2. Exposé de la technique de préparation	
et de purification utilisée.....	76
1.3. Méthode de titrage de la gamma-	
hémolysine.....	88
1.4. Recherche des activités hémolytiques	
autres que la gamma (alpha, bêta,	
delta).....	102

	<u>Pages</u>
1.5. Essais et résultats des productions..	106
1.6. Exposé des différents facteurs et discussion de leur rôle dans la production de la gamma-hémolysine....	125
1.7. Caractères et étude de la gamma- hémolysine obtenue.....	129
2. RECHERCHE DES ANTICORPS ANTI-GAMMA- HEMOLYSINE STAPHYLOCOCCIQUES.....	138
Introduction.....	139
2.1. Méthode de titrage des anticorps anti-gamma-hémolysine.....	140
2.2. Méthode de titrage des anticorps anti-alpha-hémolysine.....	148
3. EXPERIMENTATION ANIMALE.....	152
Introduction.....	153
3.1. Détermination du taux normal d'anti- gamma-hémolysine chez le lapin.....	154
3.2. Etude de la réponse des anticorps anti- gamma-hémolysine staphylococcique au cours de l'ostéo-arthrite expérimentale du lapin.....	156
3.3. Etude comparative de la réponse en anticorps anti-gamma et anti-alpha- hémolysine staphylococcique au cours de l'ostéo-arthrite expérimentale chez le lapin.....	174
3.4. Etude de l'activité immunogène de la gamma-hémolysine.....	182
Conclusion.....	186
4. ETUDE CLINIQUE.....	188
Introduction.....	189
4.1. Matériel et méthode.....	190
4.2. Détermination du taux normal d'anti- gamma-hémolysine.....	192
4.3. Etude du taux d'anticorps anti-gamma- hémolysine chez les sujets présentant une ostéo-arthrite infectieuse.....	195
Conclusion.....	208

	<u>Pages</u>
CONCLUSIONS.....	209
SUMMARY.....	210
BIBLIOGRAPHIE.....	211
TABLE DES MATIERES.....	226
